

In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful



### Copyright disclaimer

"La faculté" is a website that collects medical documents written by Algerian assistant professors, professors or any other health practicals and teachers from the same field.

Some articles are subject to the author's copyrights.

Our team does not own copyrights for some content we publish.

"La faculté" team tries to get a permission to publish any content; however , we are not able to contact all authors.

If you are the author or copyrights owner of any kind of content on our website, please contact us on: [facadm16@gmail.com](mailto:facadm16@gmail.com) to settle the situation.

All users must know that "La faculté" team cannot be responsible anyway of any violation of the authors' copyrights.

Any lucrative use without permission of the copyrights' owner may expose the user to legal follow-up.



## **Chapitre II :**

# **Méthodes d'étude de la cellule**

**Conçu par  
Mme F. Foukrache**

# Objectifs principaux

**Objectif 1: Citer les instruments d'observation des cellules**

**Objectif 2: Nommer les techniques utilisées.**

**Objectif 3: Associer l'instrument d'observation et la technique préparatoire de l'échantillon approprié à l'objectif recherché.**



# Objectifs spécifiques

## A - Les microscopes photoniques

### 1 - Le microscope photonique à fond clair

**Objectif 1 :**Définir la notion de pouvoir séparateur.

**Objectif 2 :**Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair(microscope optique)

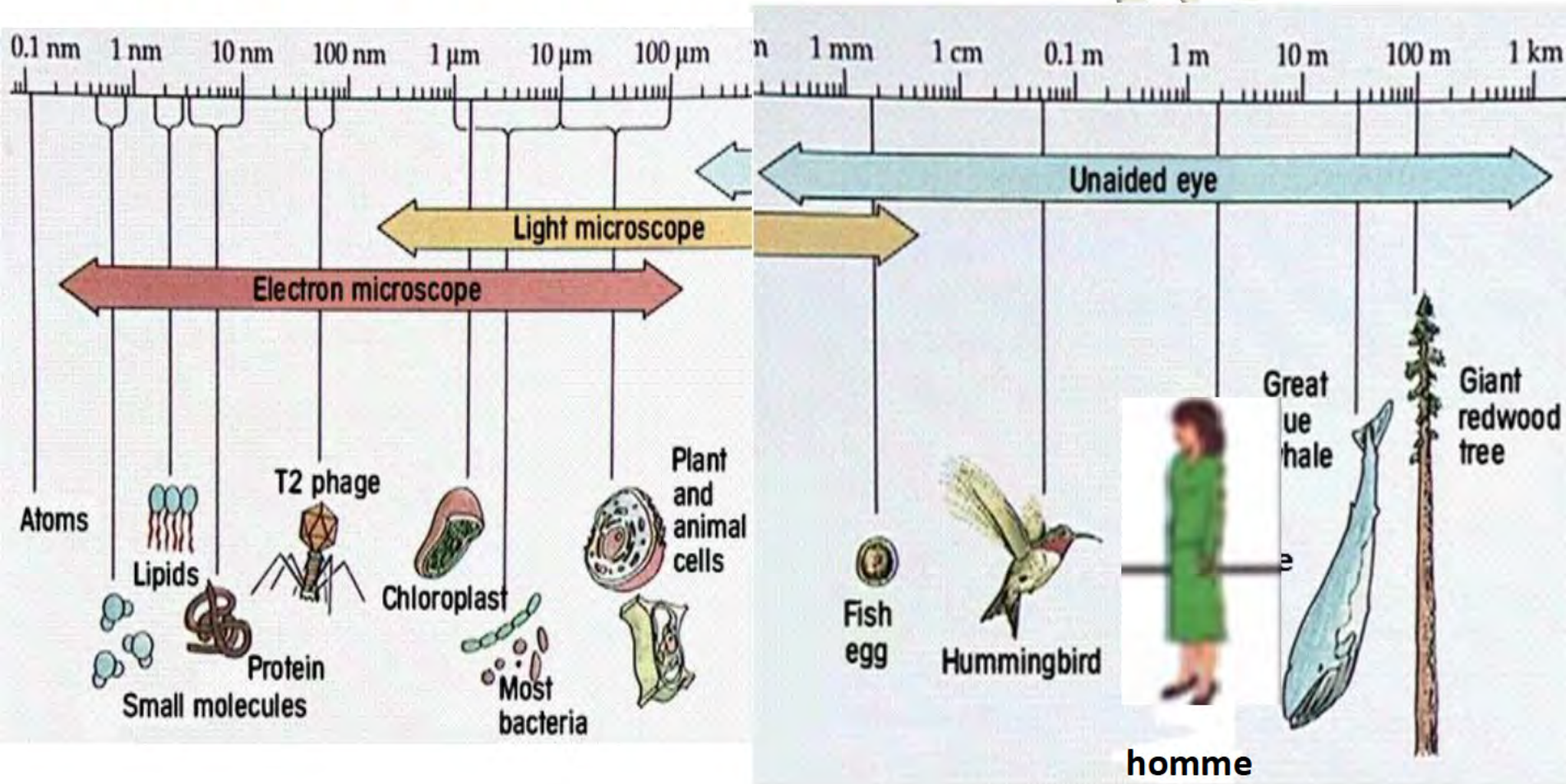
**Objectif 3 :**Indiquer les domaines de son application.

**Objectif 4 :**Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue d'une observation au microscope à fond clair (la technique histologique).



# Objectif 1 : Définir la notion de pouvoir séparateur

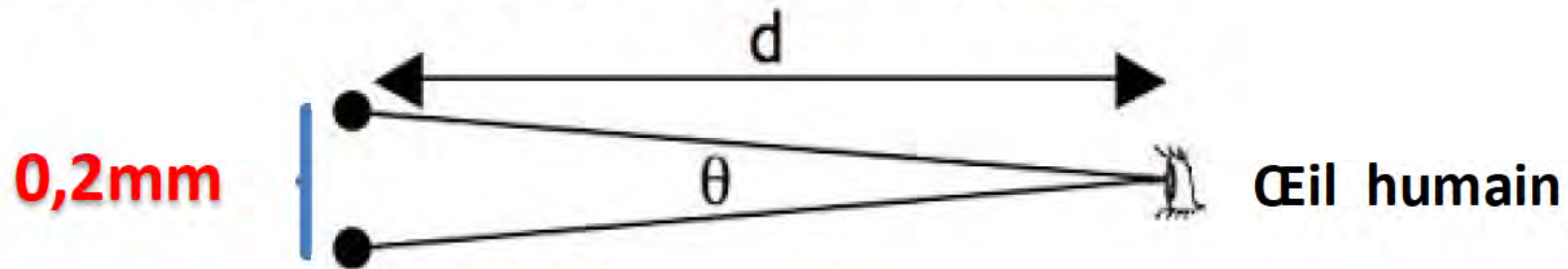
## Echelle des dimensions dans le monde du vivant



## Objectif 1 : Définir la notion de pouvoir séparateur

### Notion de pouvoir séparateur = limite de résolution

- C'est la capacité de l'œil à distinguer nettement 2 points très rapprochés, il est égal à **0,2mm**



- Organismes de taille plus petite  $\longrightarrow$  **Invisibles**
- Nécessité d'utiliser des **instruments** destinés à observer de petits objets dont un système de **lentilles (optiques, électroniques ...)** fournit une image agrandie



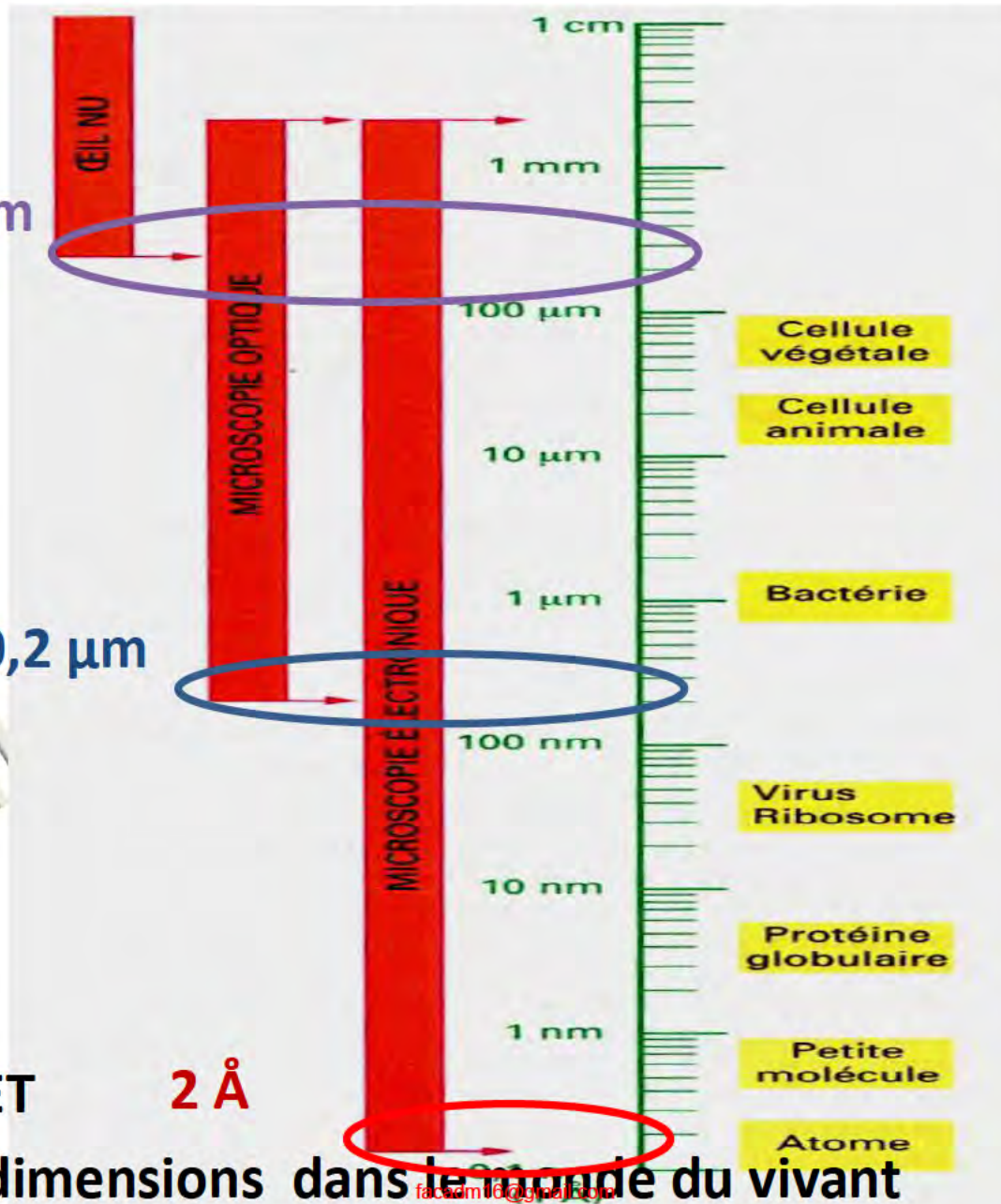
# Objectif 1 : Définir la notion de pouvoir séparateur

P S de  
l'œil 0,2 mm

P S du MO 0,2  $\mu\text{m}$

P S du MET 2 Å

Echelle des dimensions dans le monde du vivant





# Les premiers microscopes optiques



Cuff 1760



1751

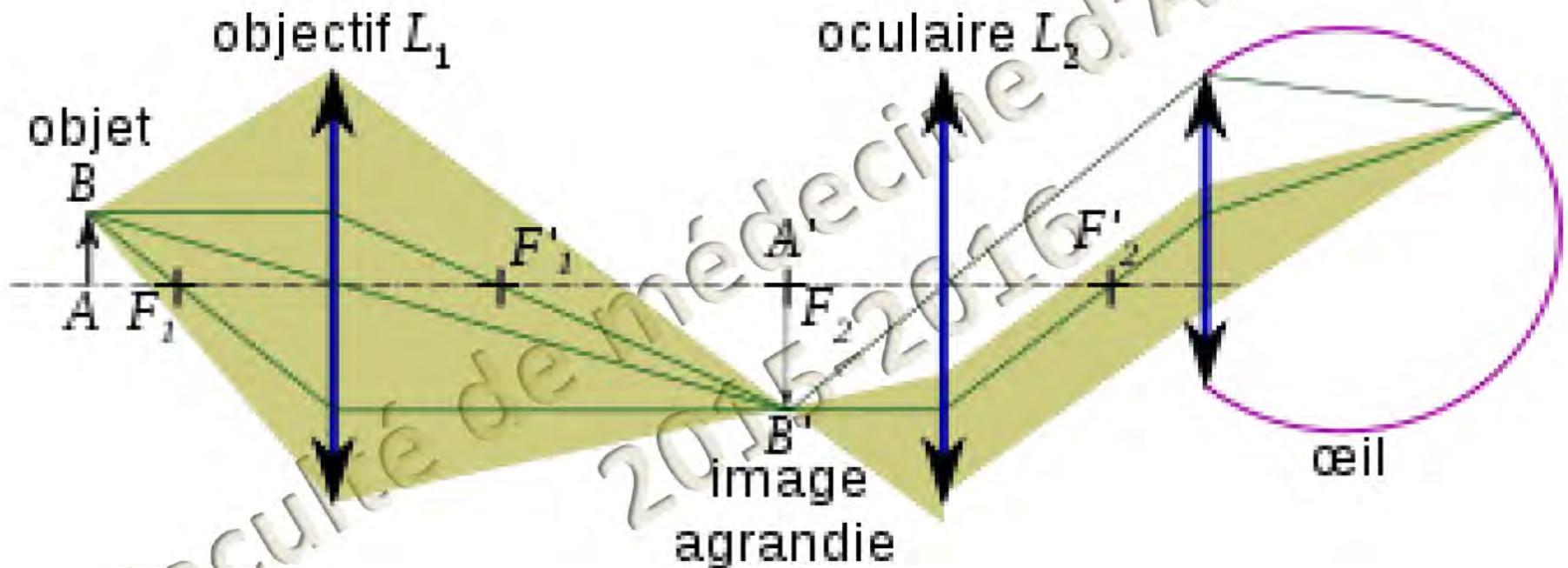
## Objectif 2 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair





**Objectif 2** : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair

## Principe de la transmission des photons



Le M O est un système **optique à lentilles** dont le but est d'obtenir une image **agrandie** de l'échantillon à observer :

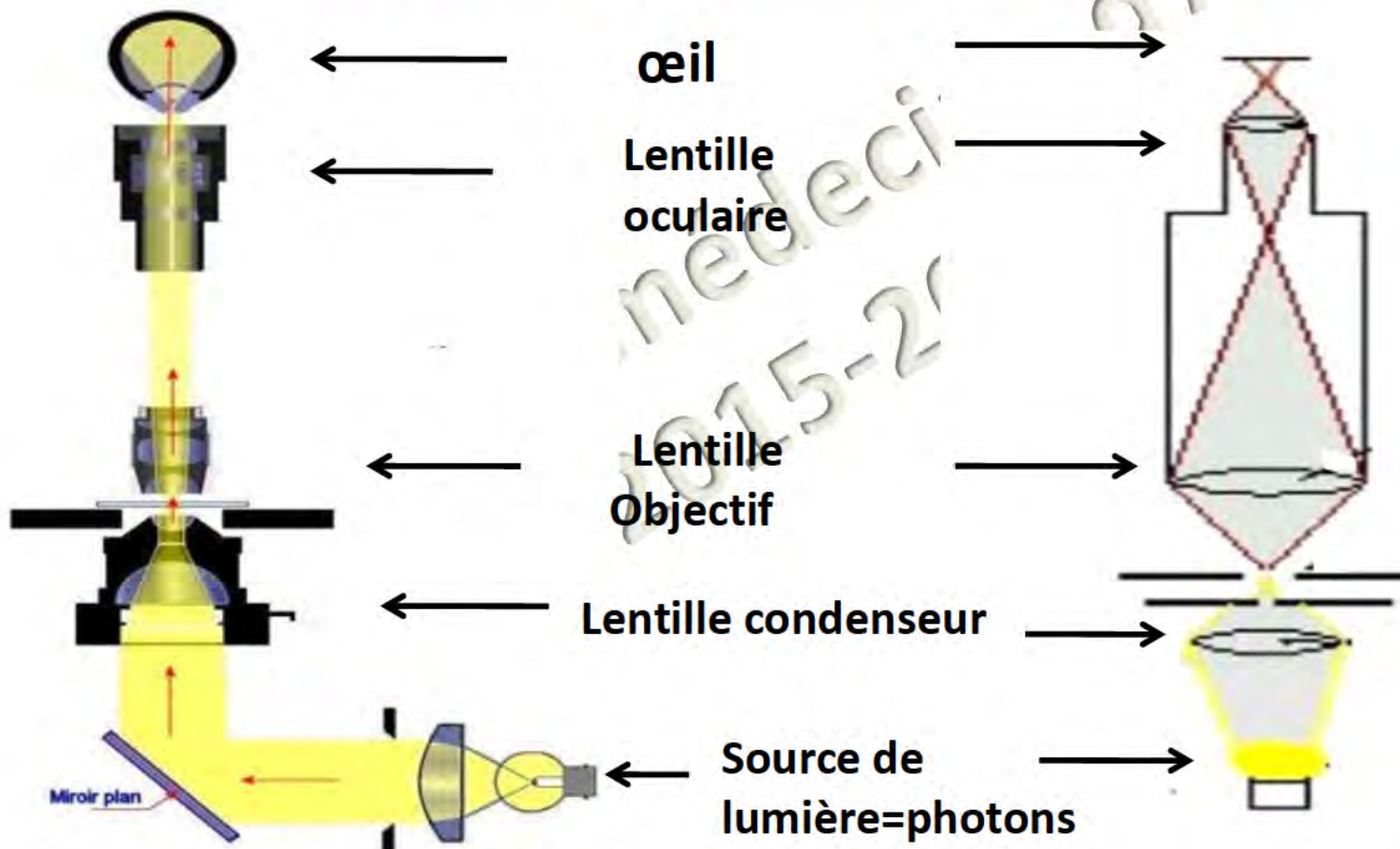
**L'objectif**  $\longrightarrow$  à image agrandie inversée

**L'oculaire**  $\longrightarrow$  à image agrandie virtuelle



## Objectif 2 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair

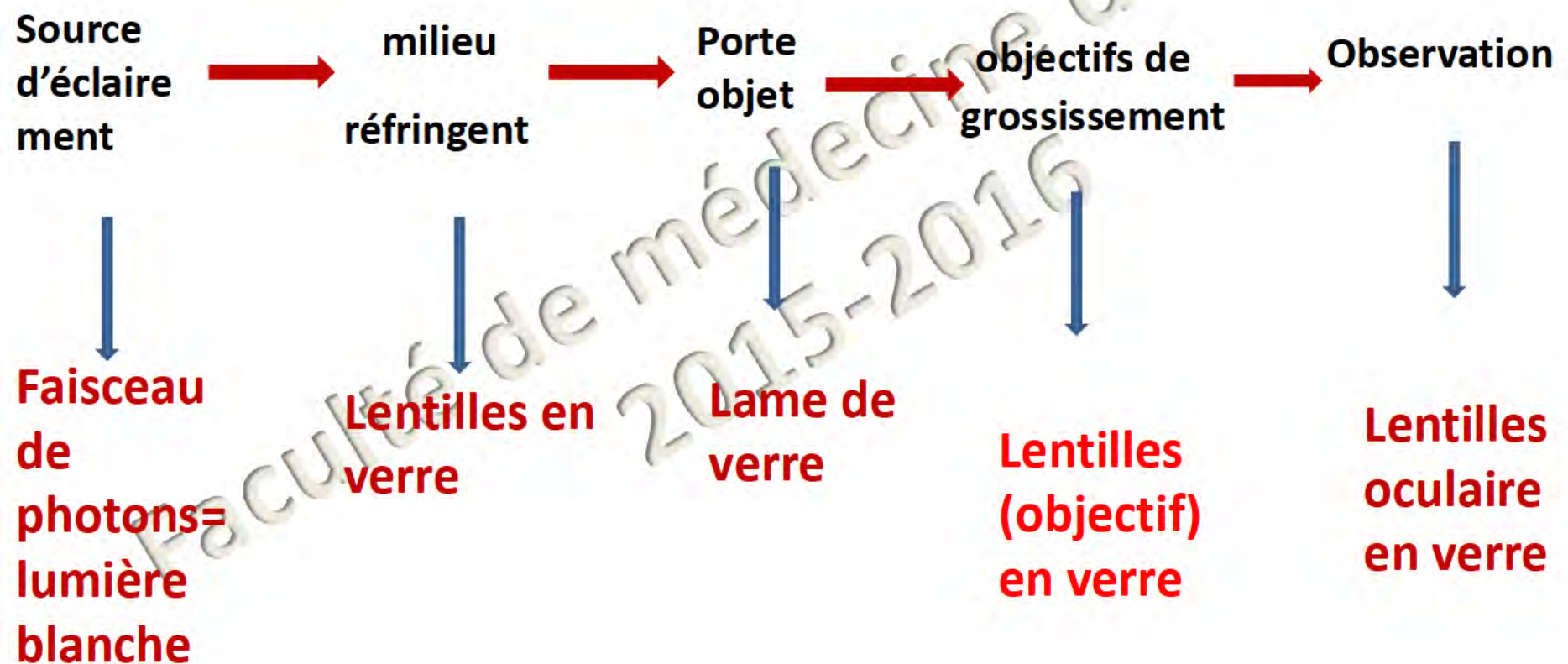
### Observation par transmission



**Schéma montrant le chemin suivi par le faisceau de photons**

**Objectif 2** : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair

## Principe de fonctionnement du M O



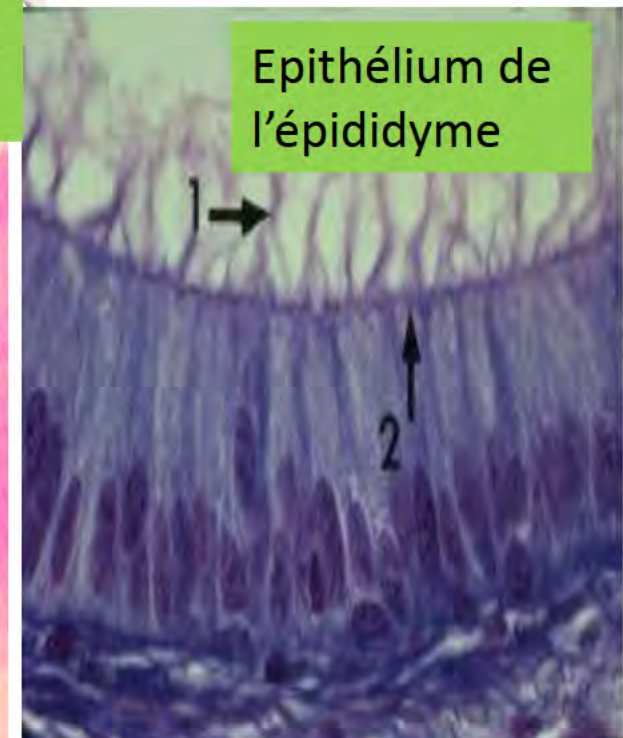
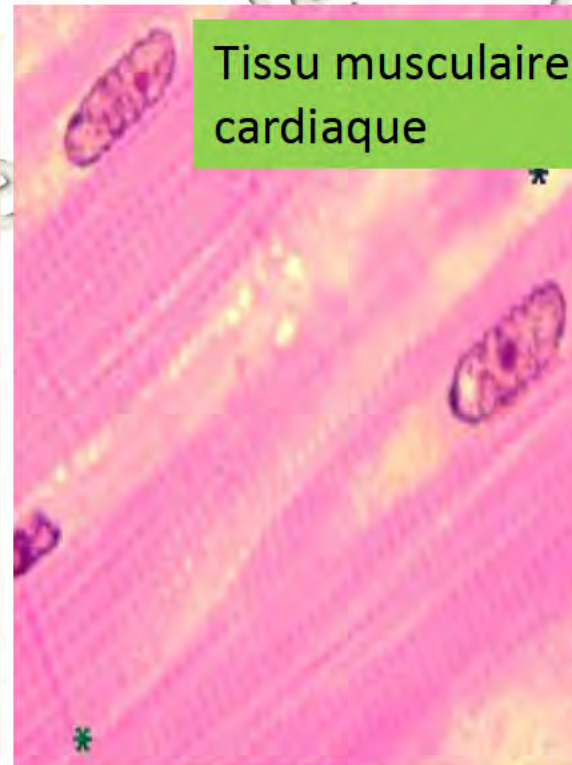
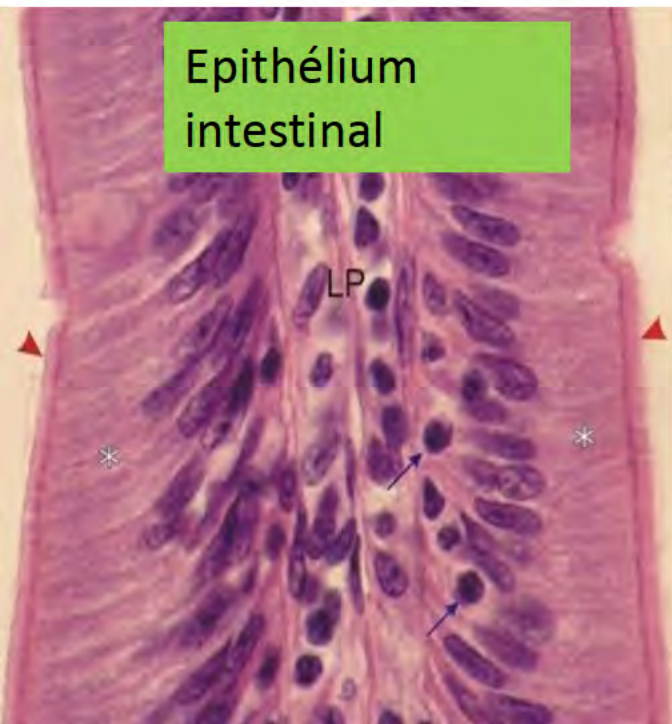
**Résultat** : image en couleur



## Objectif 3 : Indiquer les domaines d'application de la microscopie photonique

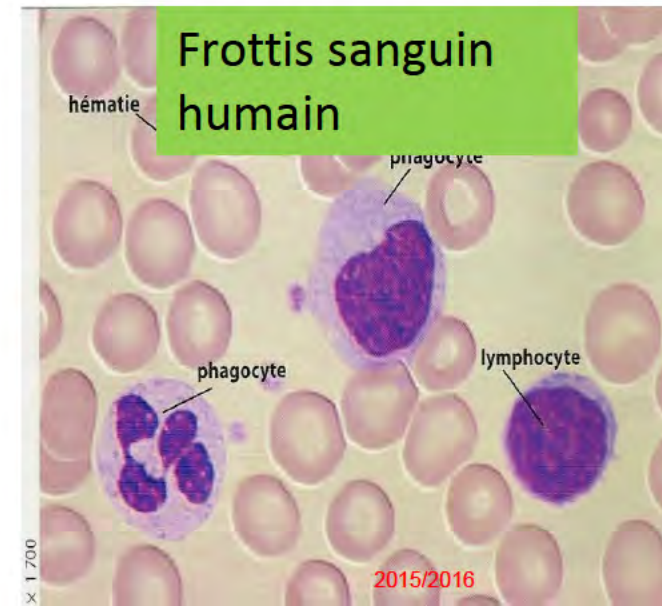
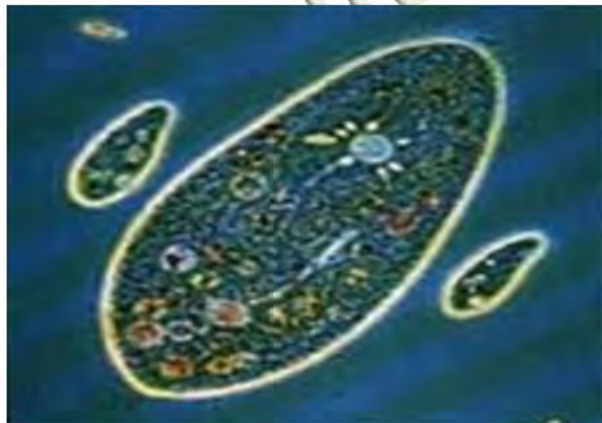
### Description structurale des tissus et des cellules ;

- Taille , Forme cellulaire et tissulaire
- Forme et position des noyaux



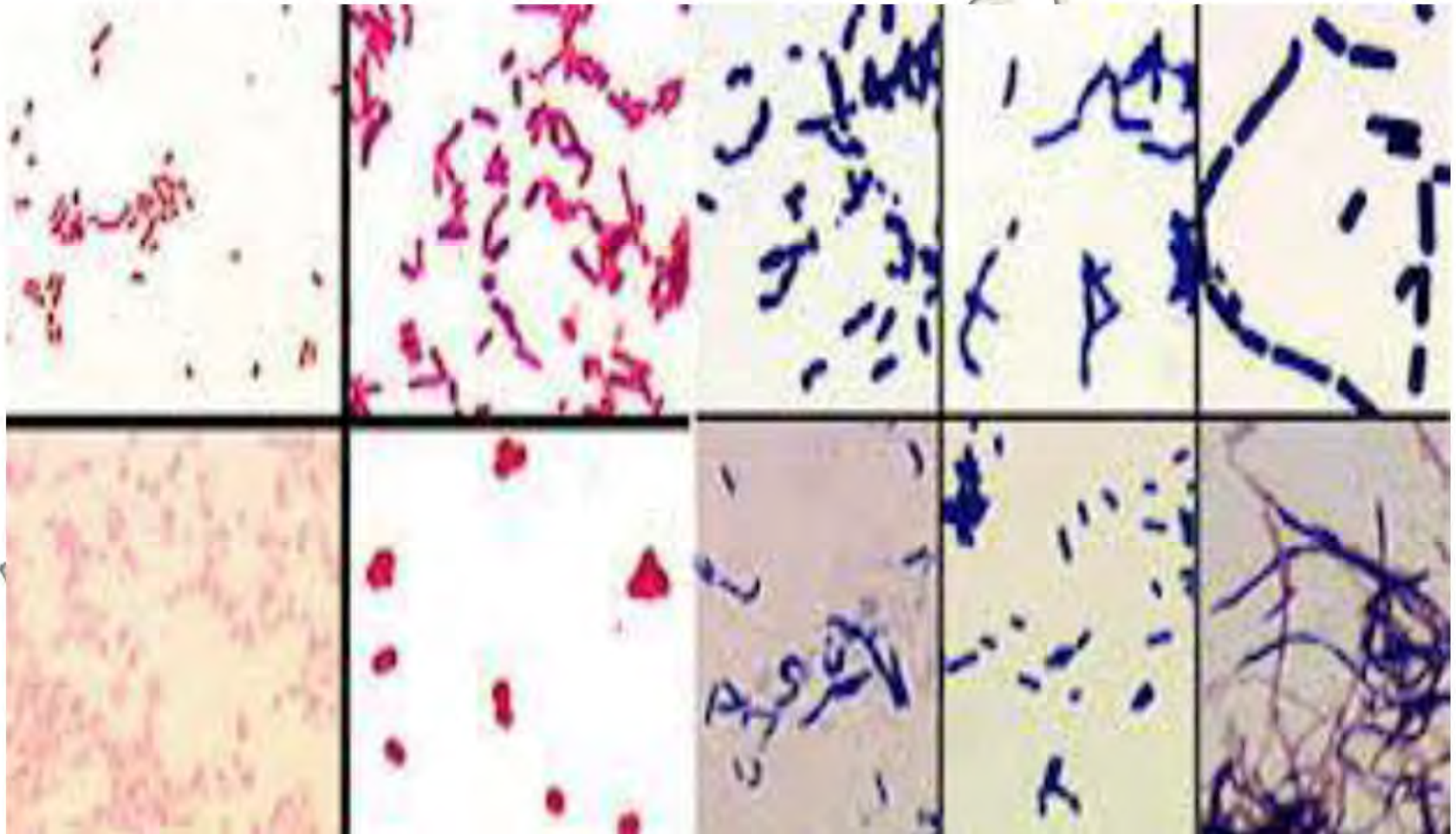


## Objectif 3 : Indiquer les domaines d'application de la microscopie photonique



## **Objectif 3 : Indiquer les domaines d'application de la microscopie photonique**

**La microscopie photonique est utilisée pour l'observation de différentes formes bactériennes**





**Objectif 4 :** Citer les **étapes préparatoires** d'un échantillon en vue d'une observation au microscope à fond clair ( la technique histologique ).

### **Les étapes de la technique histologique:**

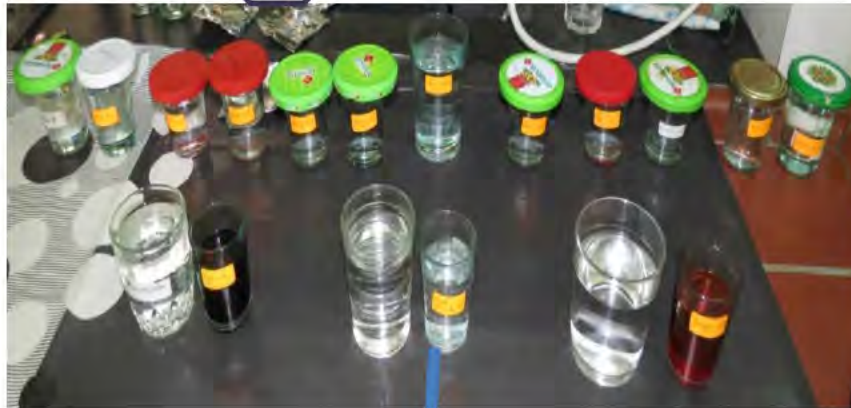
- **Prélèvement de l'organe à étudié .**
- **Fixation chimique :** figer (conserver ) les structures cellulaires tel quelles étaient à l'état du vivant .
- **Déshydratation :** enlever l'eau intracellulaire .
- **Inclusion :** imprégner le tissu dans la paraffine
- **Microtomie :** obtenir des coupes de l'ordre de 2- 10 $\mu$ m
- **Coloration chimique :** augmenter les contrastes naturels faibles ( images colorées )



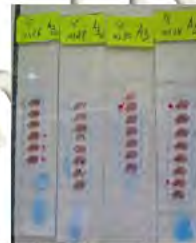
# Procédé de la technique histologique



6



Observation de la préparation  
au microscope photonique



Le **grossissement G total** du microscope  
qui a permis de réaliser l'observation est  
égal au **produit** du grossissement de  
l'objectif par le grossissement de l'oculaire  
**G total** = G de l'objectif X G de l'oculaire





# Objectifs spécifiques

## 2 - Le microscope photonique à fluorescence

**Objectif 1 :** Donner le principe de fonctionnement du microscope optique à fluorescence.

**Objectif 2 :** Déterminer les domaines de son utilisation.

**Objectif 3 :** Définir un fluorochrome ou fluomarqueur .

**Objectif 4 :** Citer des exemples de fluomarqueurs utilisés (fluorescéine, rhodamine )

**Objectif 5 :** Citer des exemples de composés cellulaires détectables en microscopie à fluorescence.

**Objectif 1 :** Donner le principe de fonctionnement du microscope optique à fluorescence

**Le MP à fluorescence = MO qui détecte une lumière fluorescente**

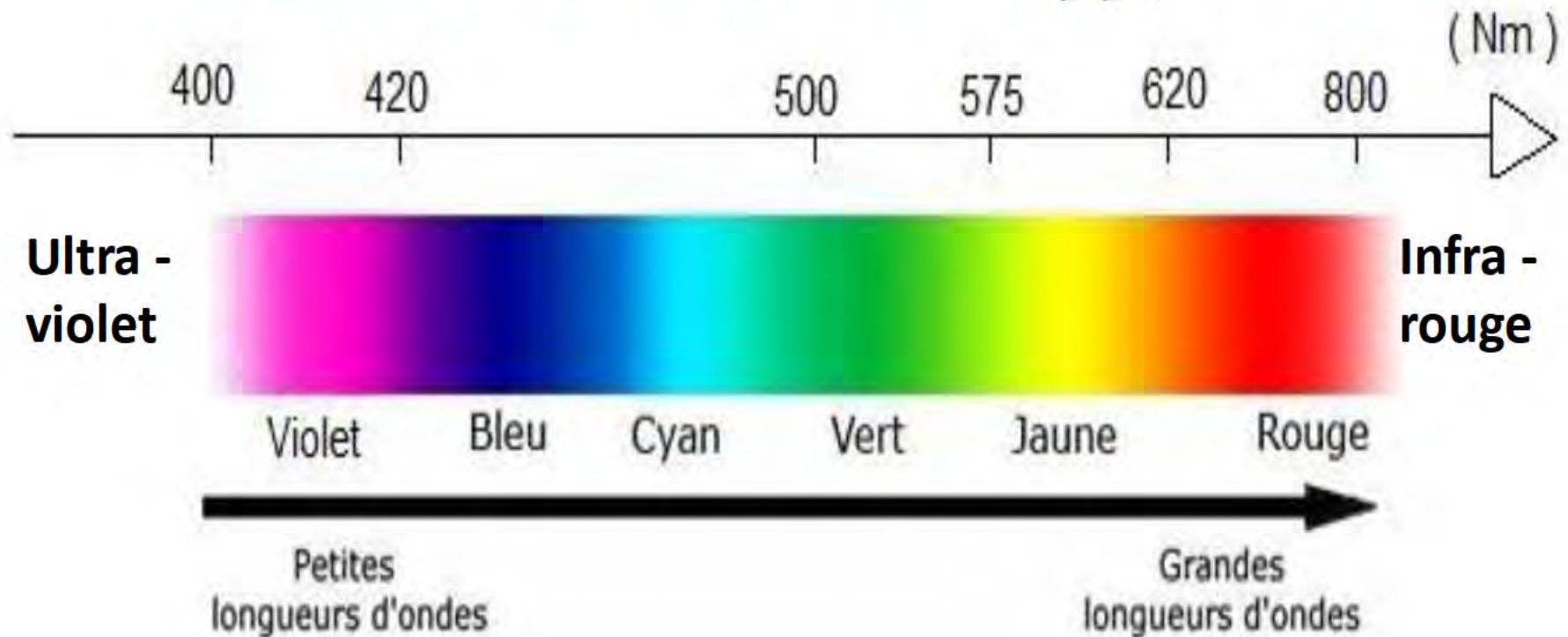


**La fluorescence** est la propriété physique de certaines **molécules** d'émettre une lumière( **dite lumière de fluorescence**) de longueur d'onde **supérieure** à la longueur d'onde **de la lumière d'excitation**



**Objectif 1 :** Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

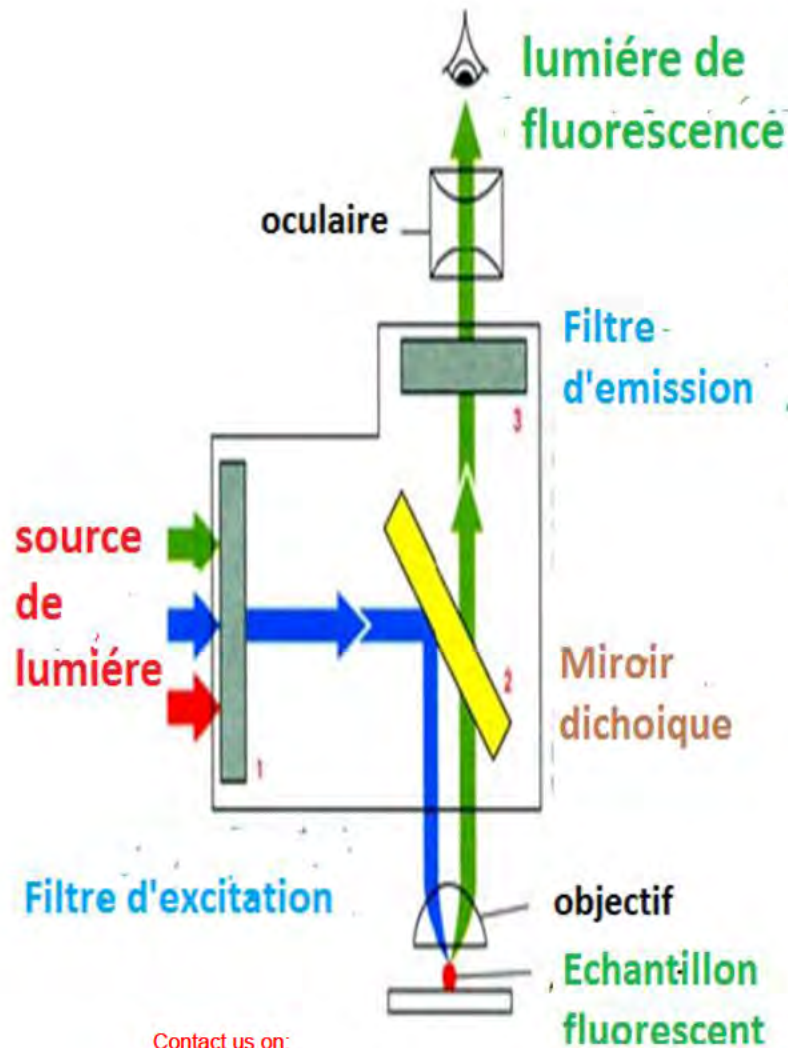
## Décomposition du Spectre de la lumière visible



**Chaque couleur du spectre visible correspond à une longueur d'onde déterminée**

# Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

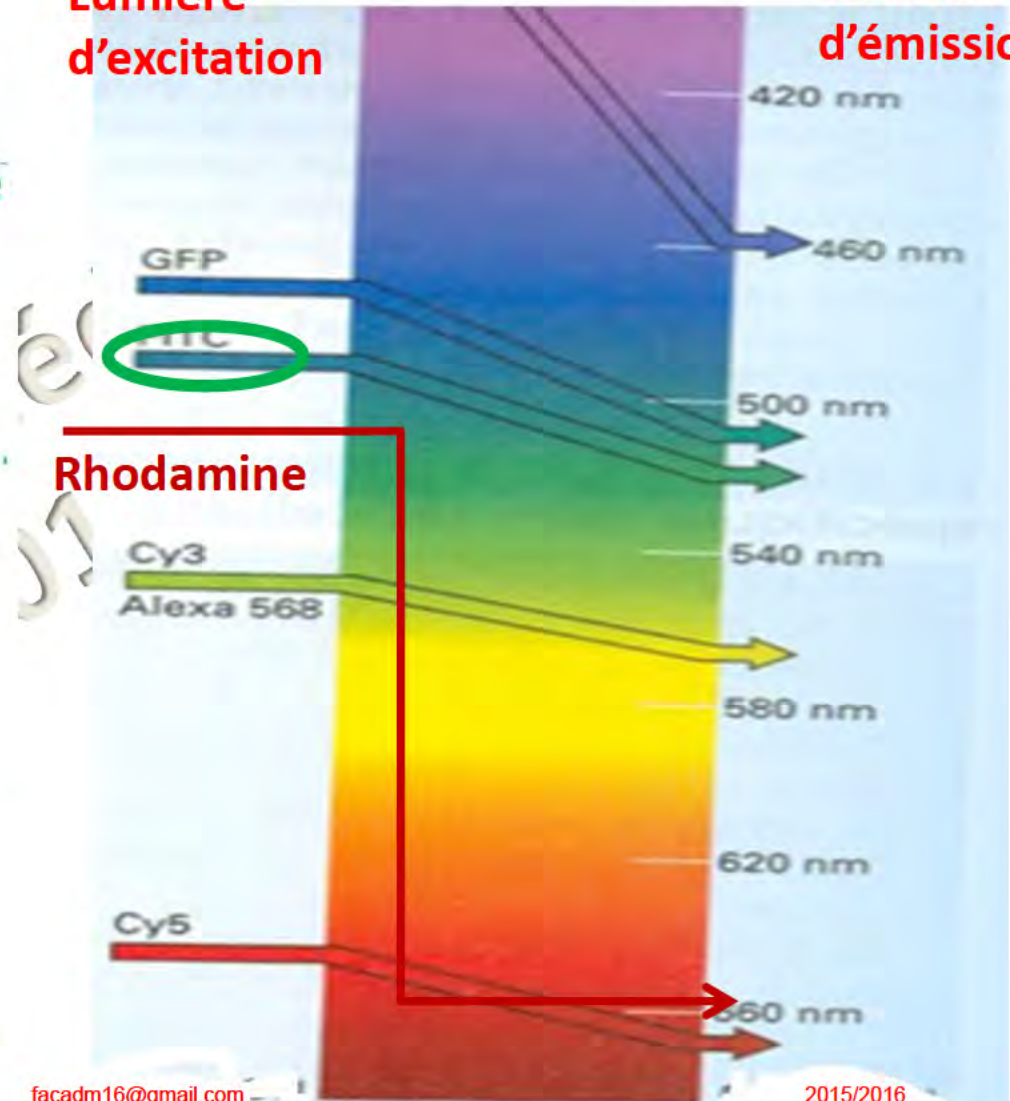
## Formation de l'image fluorescente



## Interaction lumière -- fluorochrome

**Lumière d'excitation**

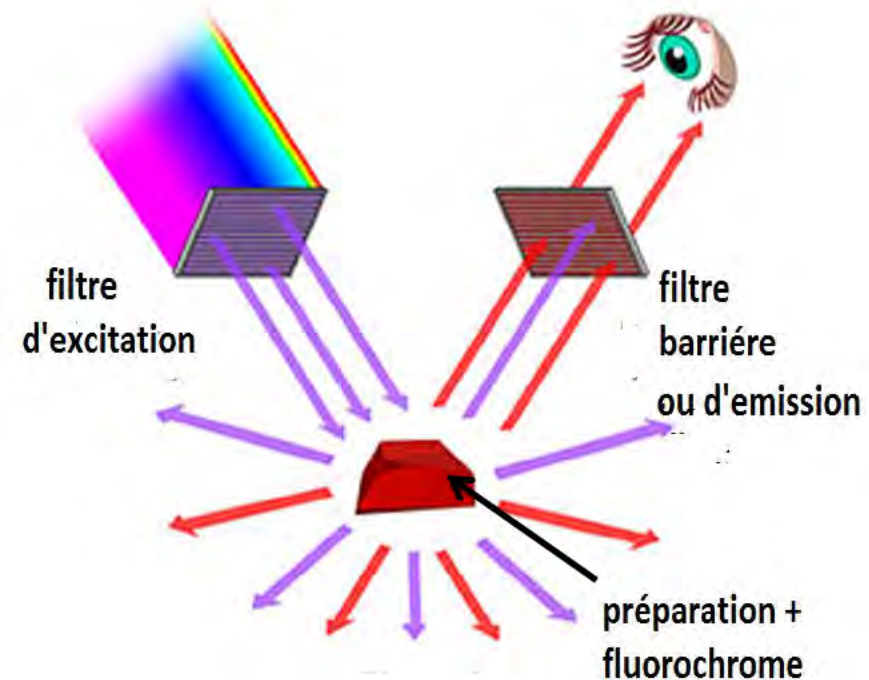
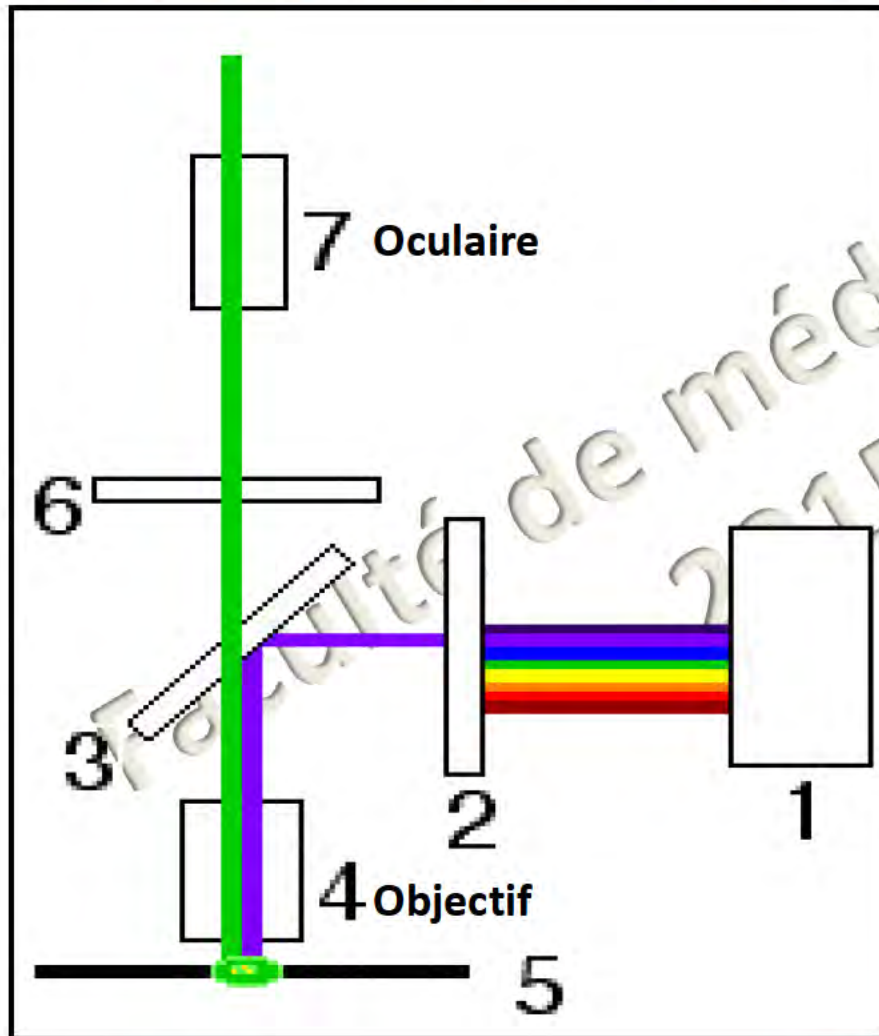
**Lumière d'émission**



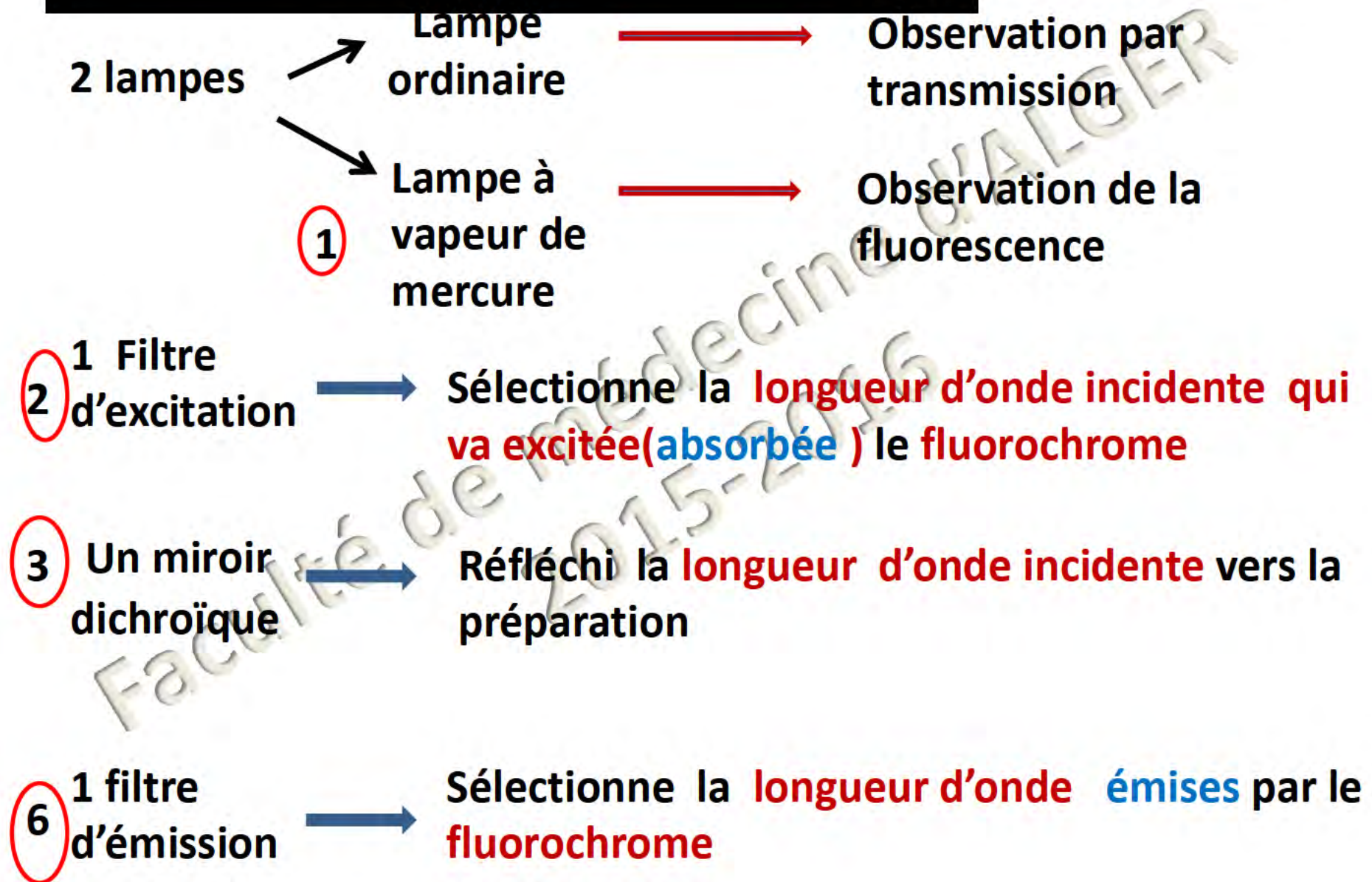


# Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

## Optique simplifiée du microscope à fluorescence



Ce type de microscope, permet de visualiser la **fluorescence** émise par les **marqueurs fluorescents** introduits dans l'échantillon à étudier. Donc un jeu de filtres est indispensable

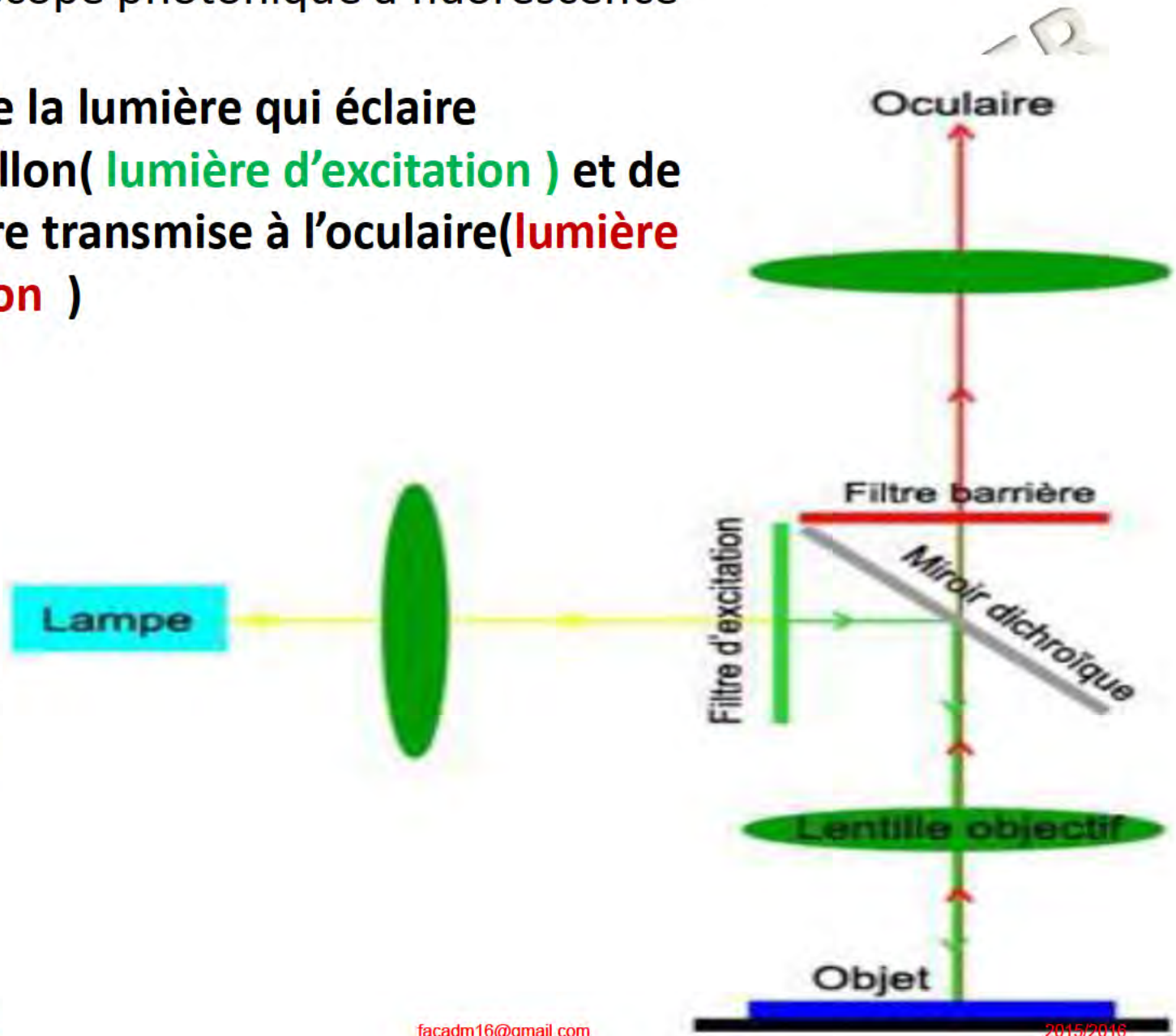




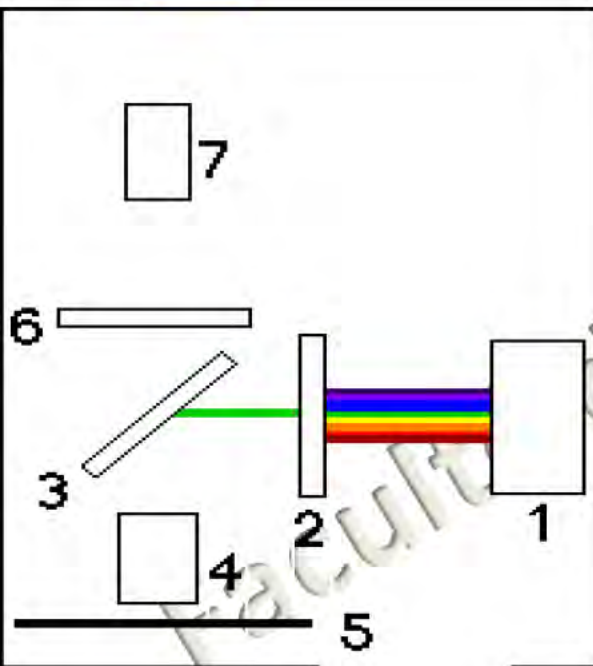
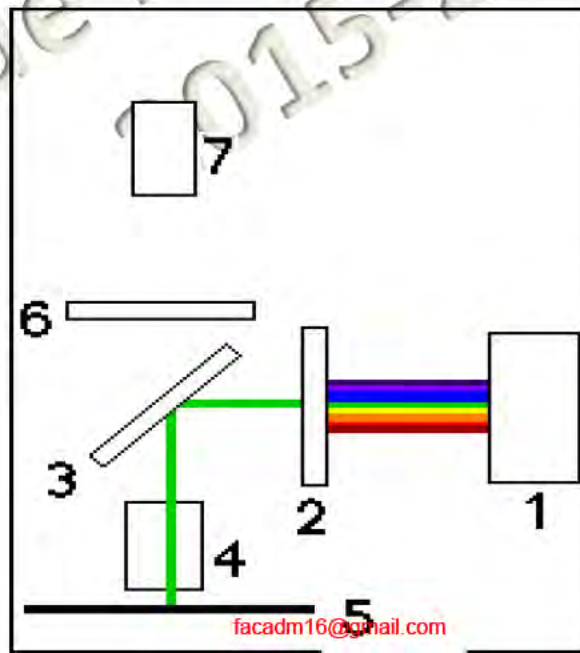
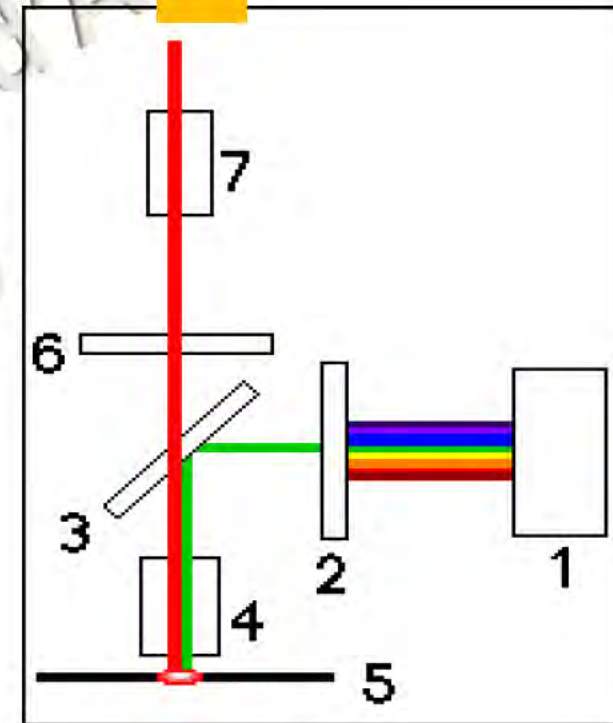
Free database on www.la-faculte.net published for NON-lucrative use

# Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

Trajet de la lumière qui éclaire l'échantillon( **lumière d'excitation** ) et de la lumière transmise à l'oculaire(**lumière d'émission** )



# Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

**1****2****3**



## **Objectif 2** : Définir un fluorochrome ou fluo marqueur

**Définition d'un fluorochrome** : c'est une substance chimique excitable par la lumière. Elle est capable d'absorber une énergie lumineuse haute dite **lumière d'excitation** et de la réémettre sous forme d'une lumière d'énergie plus faible dite **lumière de fluorescence**.

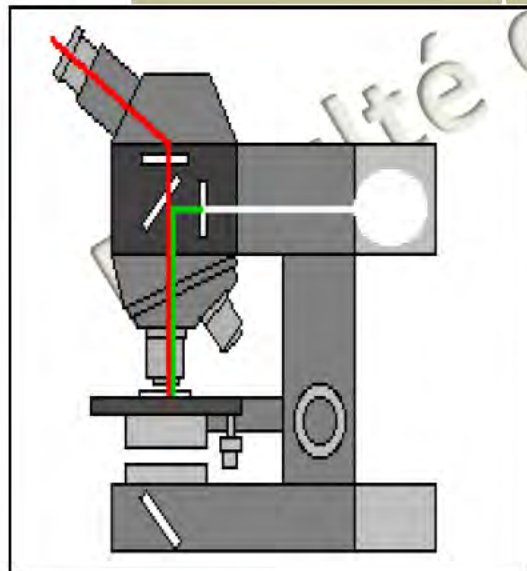
**Ex de fluorochromes** : **Fluorescéine** émet une lumière **verte** ; **Rhodamine** émet une lumière **rouge**

- Chaque molécule fluorescente (fluorochrome) a des spectres d'excitation et d'émission qui lui sont **propres** .

## Objectif 3 : citer des exemples de fluorochromes

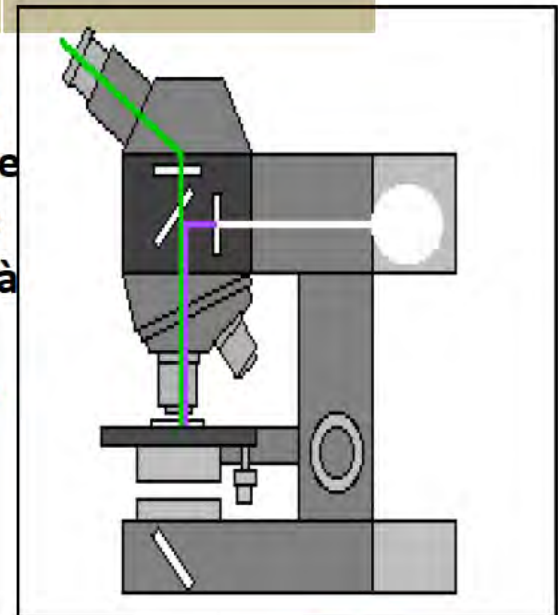
### Les marqueurs fluorescents les plus courants

Fluorochromes	Rhodamine	Fluorescéine	DAPI
Lumière d'excitation	vert	bleu	UV
Lumière d'émission	rouge	vert	bleu



Observation  
en utilisant le  
jeu de filtres  
spécifiques à  
la **rhodamine**

Observation  
en utilisant le  
jeu de filtres  
spécifiques à  
la **fluorescéine**





## Objectif 4 : Déterminer les domaines d'application de la microscopie à fluorescence

- Le microscope en fluorescence permet de visualiser des objets qui sont naturellement fluorescents ([chlorophylle](#) ,[vitamine A...](#)), ou des molécules rendues fluorescentes pour mieux les observer et éventuellement suivre leur parcours.
- Etudier au niveau cellulaire et moléculaire les structures biologiques, leur fonctionnement et leurs interactions ( division cellulaire, motilité, transport, sécrétion, communication neuronale, etc.).
- Technique essentielle dans le diagnostic clinique (par exemple, immunologie, pathologie, microbiologie, cytogénétique) et les environnements de recherche

**Objectif 4** : Déterminer les domaines d'application de la microscopie à fluorescence

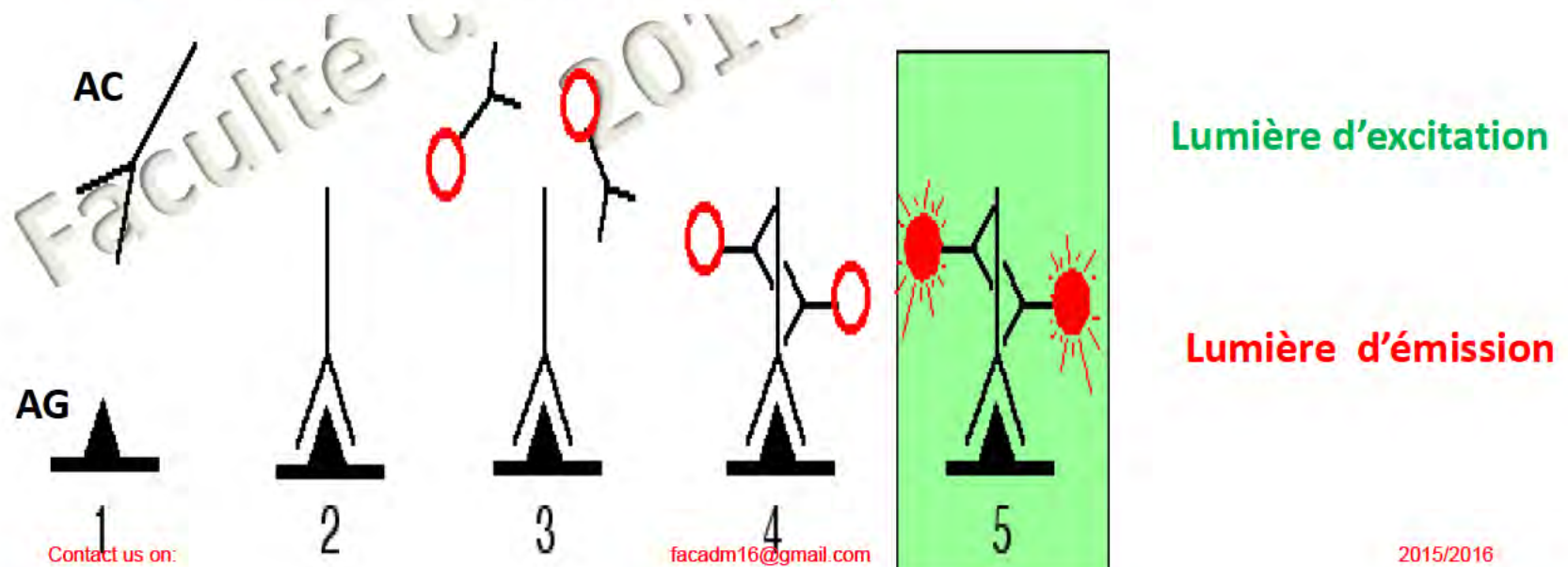
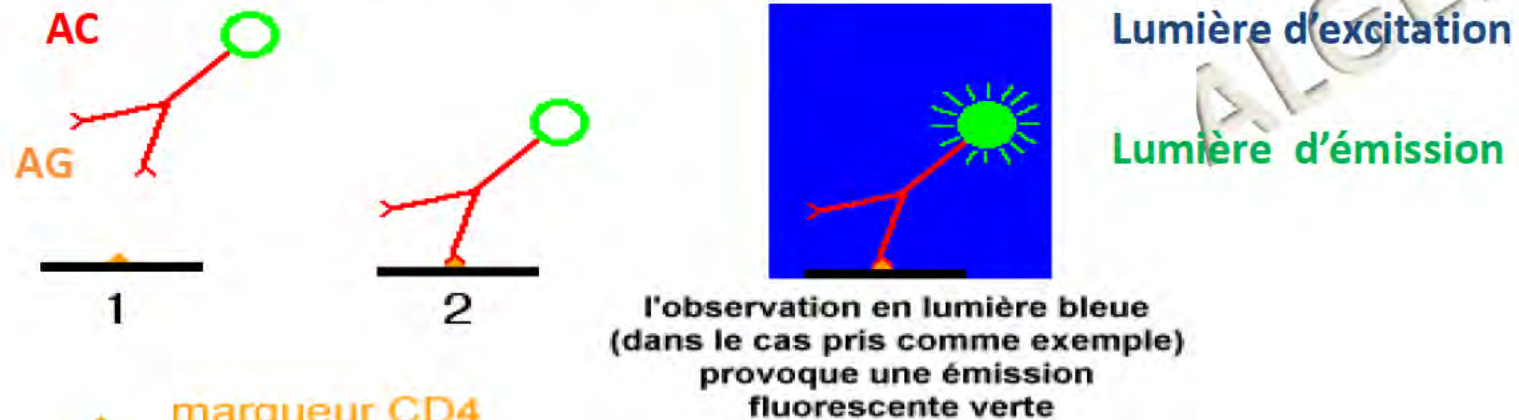
### **Application de la technique de fluorescence**

Pour induire la fluorescence , les **molécules fluorescentes** ( **fluorochromes** ) sont liées à des **AC** qui vont se fixer spécifiquement sur les molécules recherchées ( **AG** ) selon **le principe de la réaction immunitaire AC-AG** ce qui rendra facile la détection des complexes AG - AC

→ **Technique d' immunofluorescence ou d'immuno-marquage .**

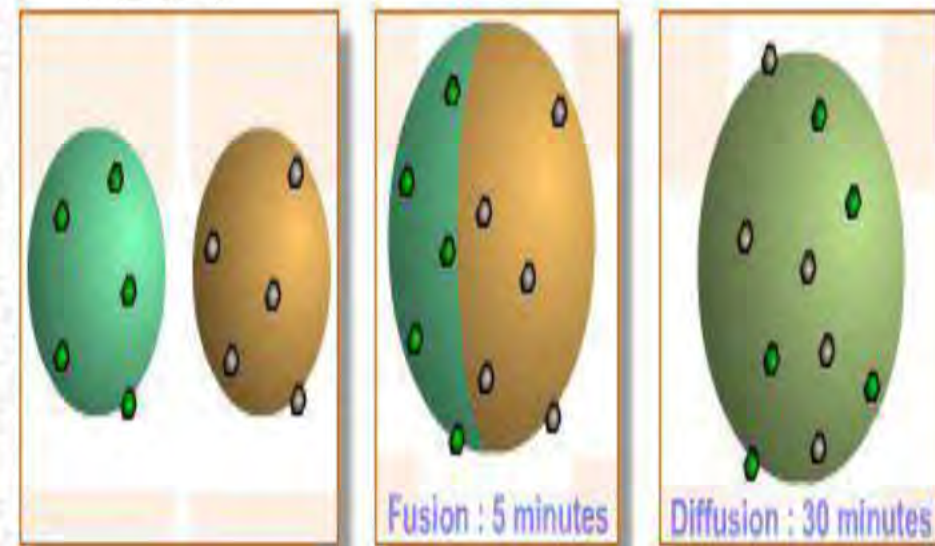
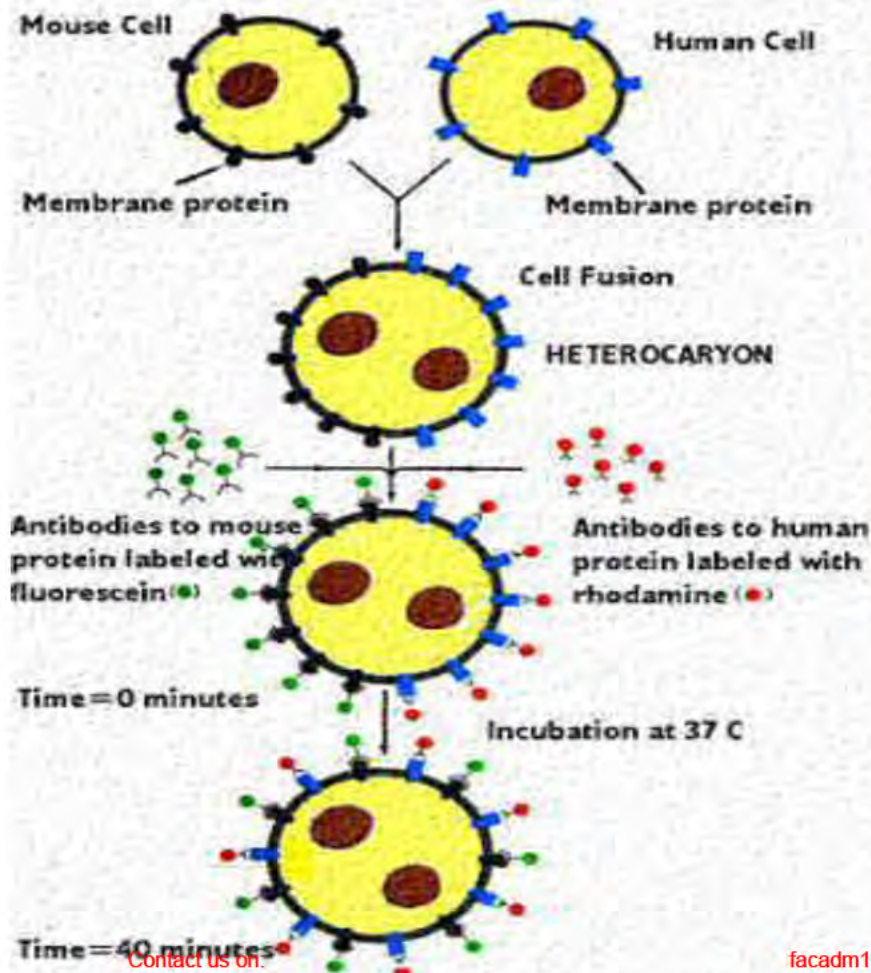


## Objectif 4 : Déterminer les domaines d'application de la microscopie à fluorescence



## Objectif 5 : Citer des exemples de composés cellulaires détectables en microscopie à fluorescence.

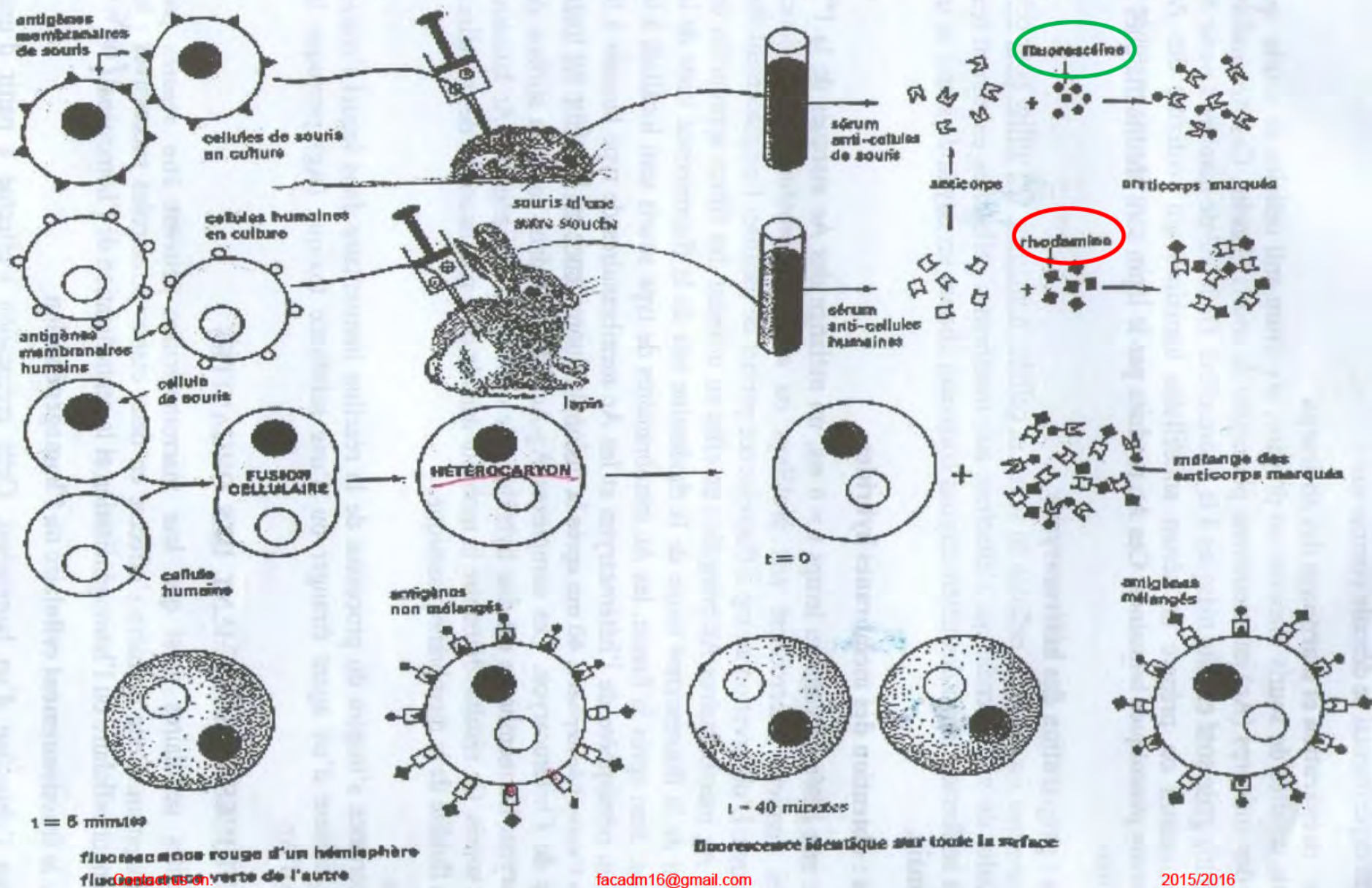
### 1 – Détecter et Suivre la fluidité des **protéines membranaires** (expérience de Fry – EDIDIN P .35 )



**Résultats :** déplacement des protéines par **diffusion latérale** dans le plan membranaire .



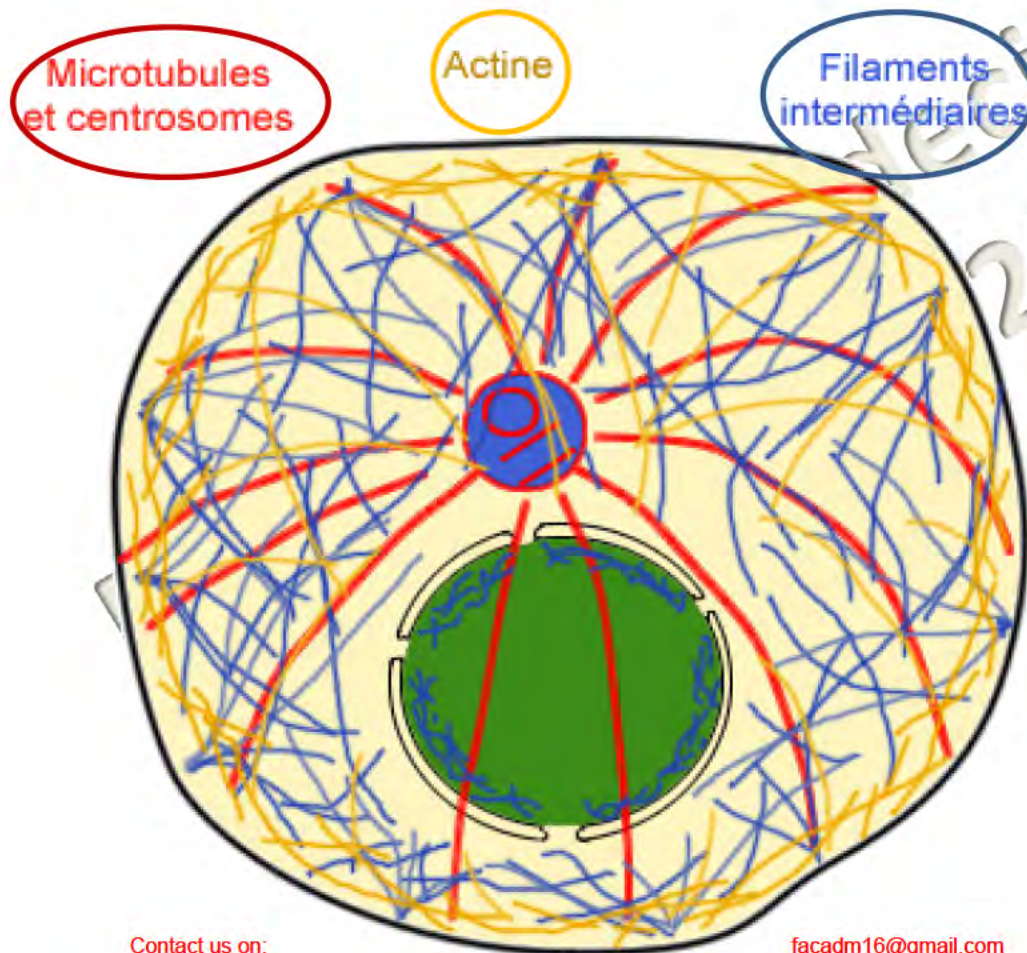
# Expérience d'immuno marquage de Frye et Edidin ( 1970 ) p .35





## Objectif 4 : Déterminer les domaines d'application de la microscopie à fluorescence

**2 -** Détecter , localiser , quantifier des protéines cellulaires comme les hormones, récepteurs, , **les protéines du cytosquelette** .....



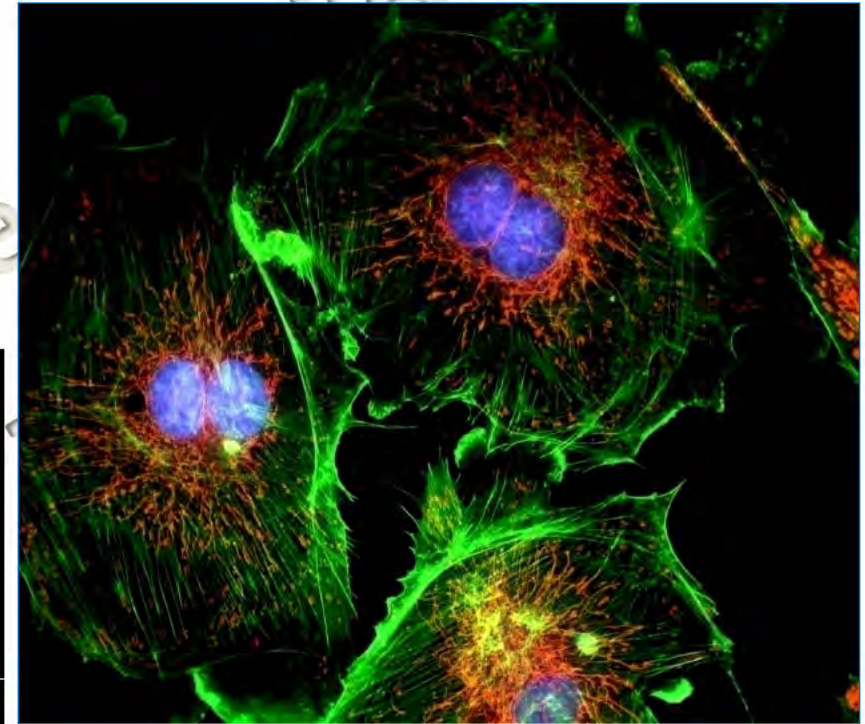
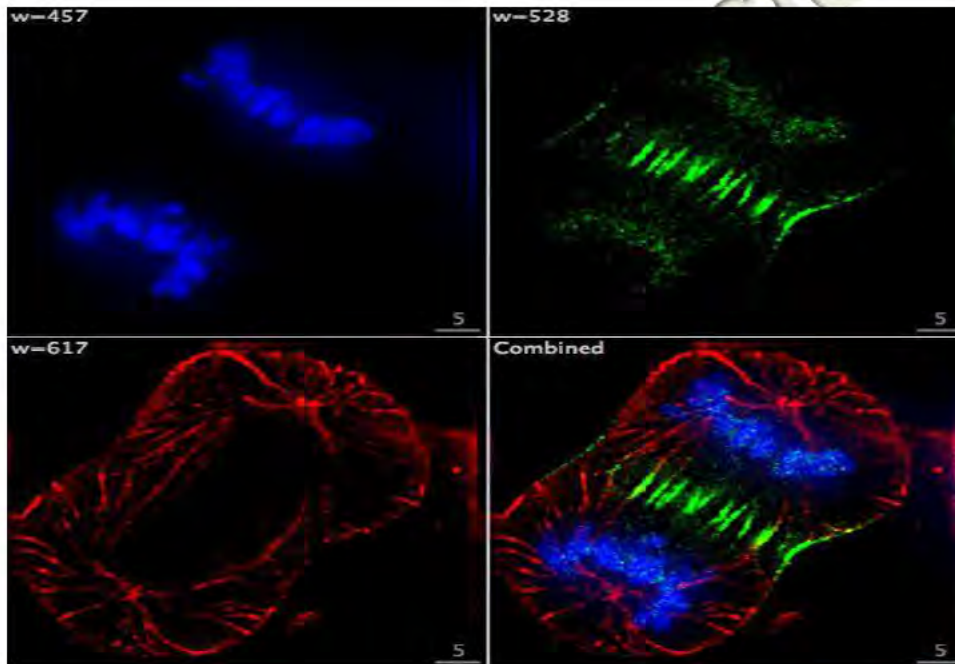
Distribution des **éléments du cytosquelette** dans le hyaloplasme d'une cellule eucaryote



## Objectif 4 : Déterminer les domaines d'application de la microscopie à fluorescence

**2** -Détection, localisation et quantification de protéines cellulaires (hormones, récepteurs, **Cytosquelette**....)

**Mitose** observée au microscope à fluorescence en utilisant plusieurs fluorochromes



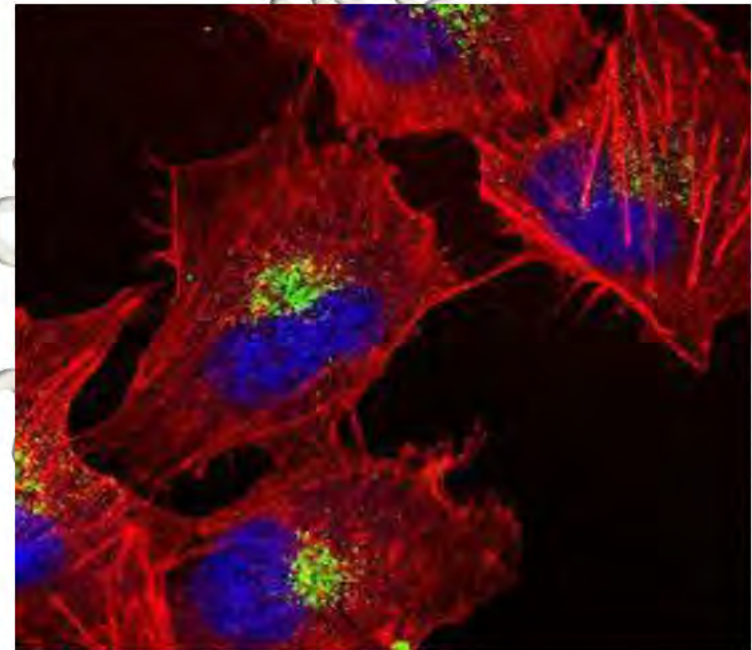
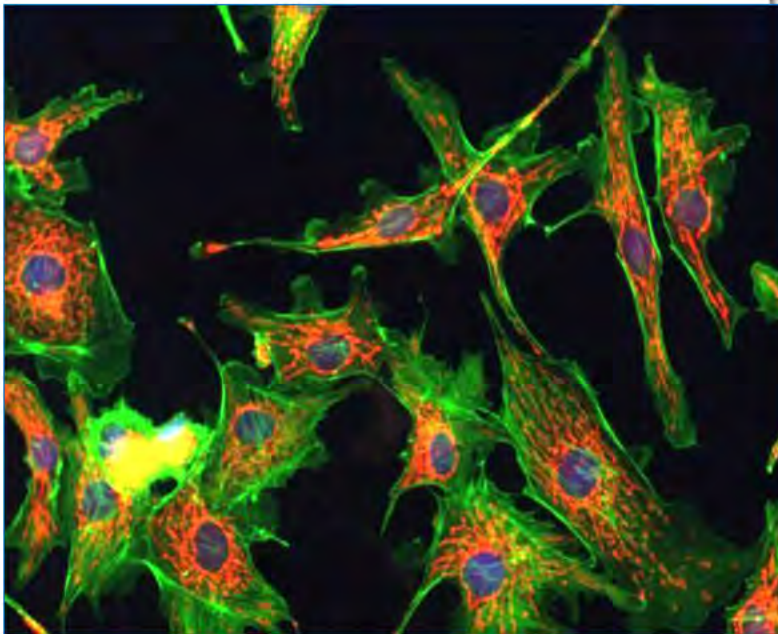
Répartition des éléments du cytosquelette dans des cellules en division (microfilaments d'actines en vert , microtubules en rouge )



# Objectif 4 : Déterminer les domaines d'application de la microscopie à fluorescence

**2** -Détection, localisation et quantification de protéines cellulaires (hormones, récepteurs, **Cytosquelette**....)

Répartition des éléments du cytosquelette dans des cellules **nerveuses**



Marquage de structures intracellulaires ( **noyau en bleu (DAPI)** et **microfilaments d'actines en rouge** ) et suivi de l'internalisation d'une protéine ( **la transferrine en vert** )



# Objectifs spécifiques

## B – les microscopes électroniques

### 1 - le microscope électronique à transmission

**Objectif 1 :** Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET).

**Objectif 2 :** Déterminer les domaines de son utilisation.

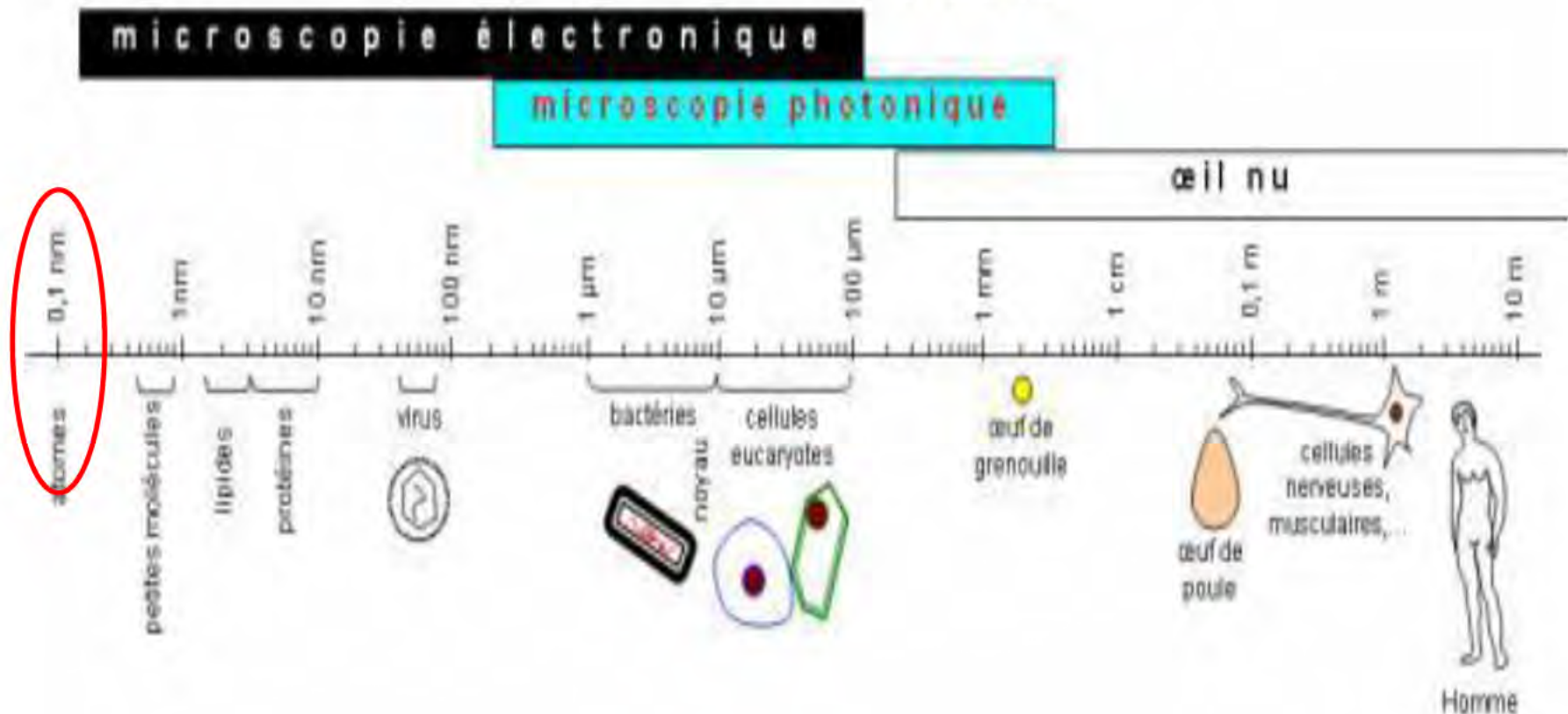
**Objectif 3 :** Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de sa caractérisation ultrastructurale (technique des coupes minces et contraste positif).

**Objectif 4 :** Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive, négative, autoradiographie).

**Objectif 5 :** Indiquer l'apport de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon.

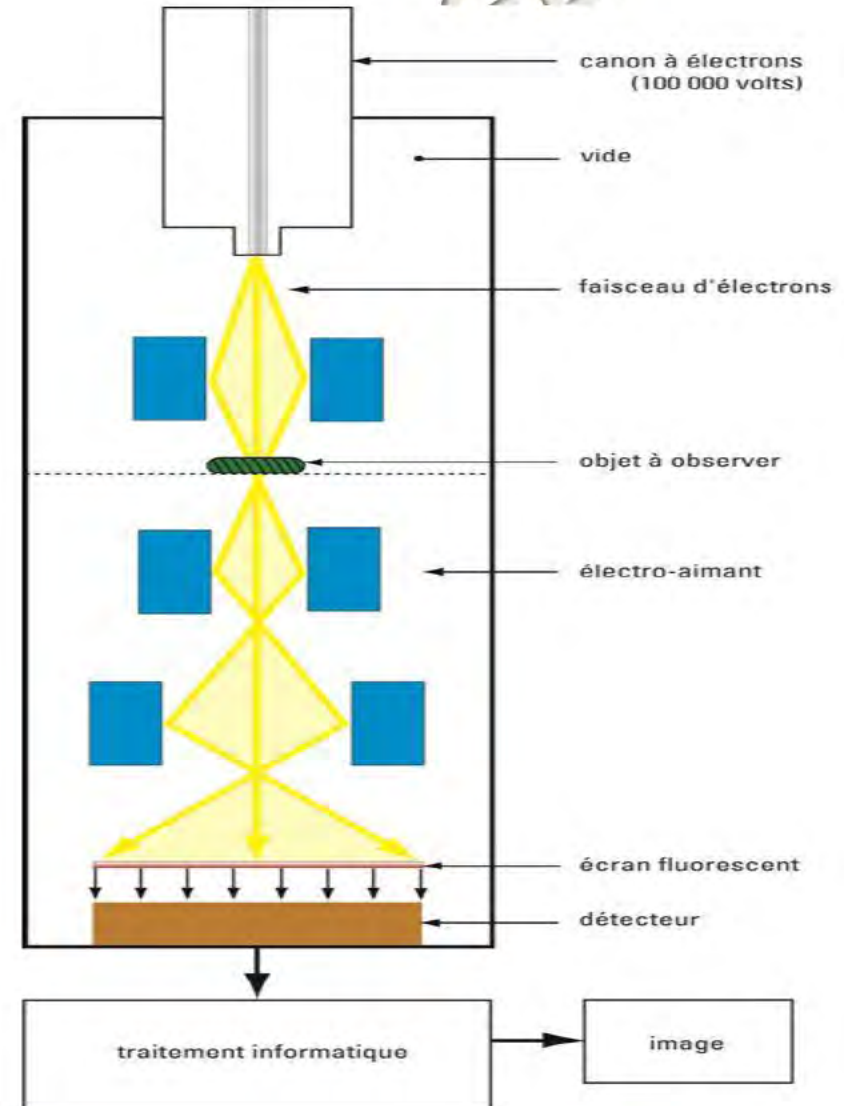
# 1- Le microscope électronique à transmission

## Echelle d'observation du vivant





# Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET).



**Objectif 1** : Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET)

## Principe de fonctionnement du MET

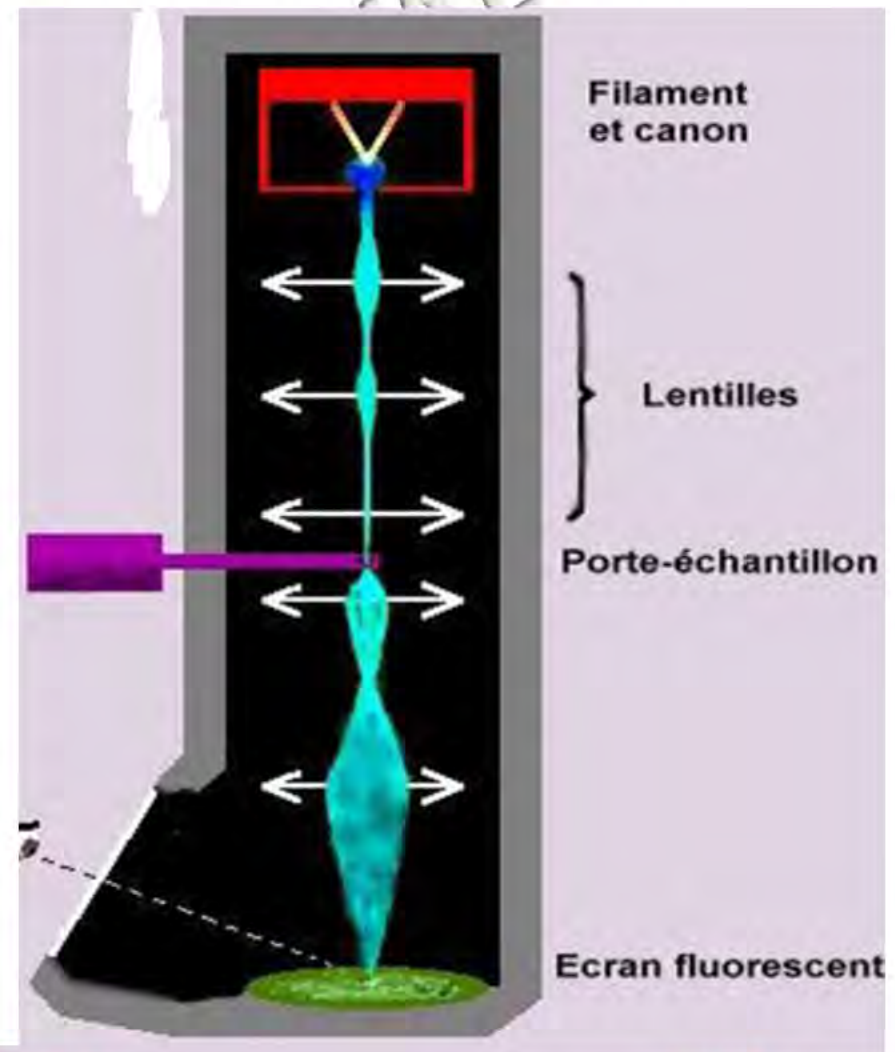
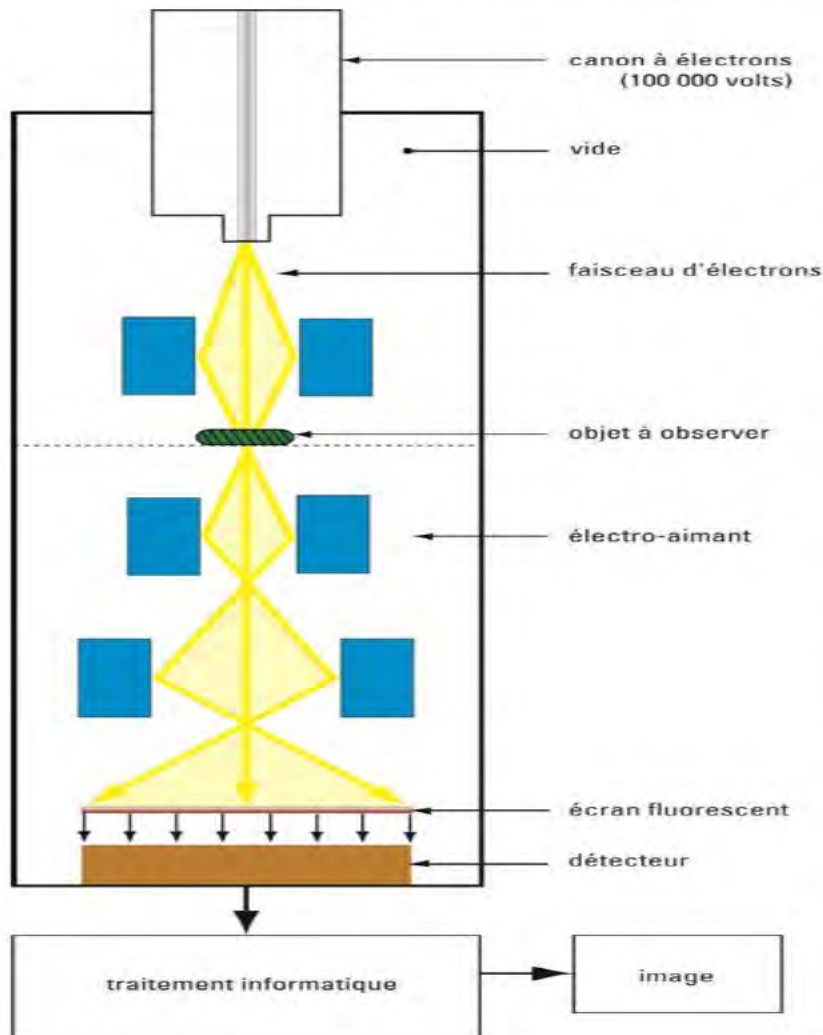


**Résultat** : image en noir et blanc



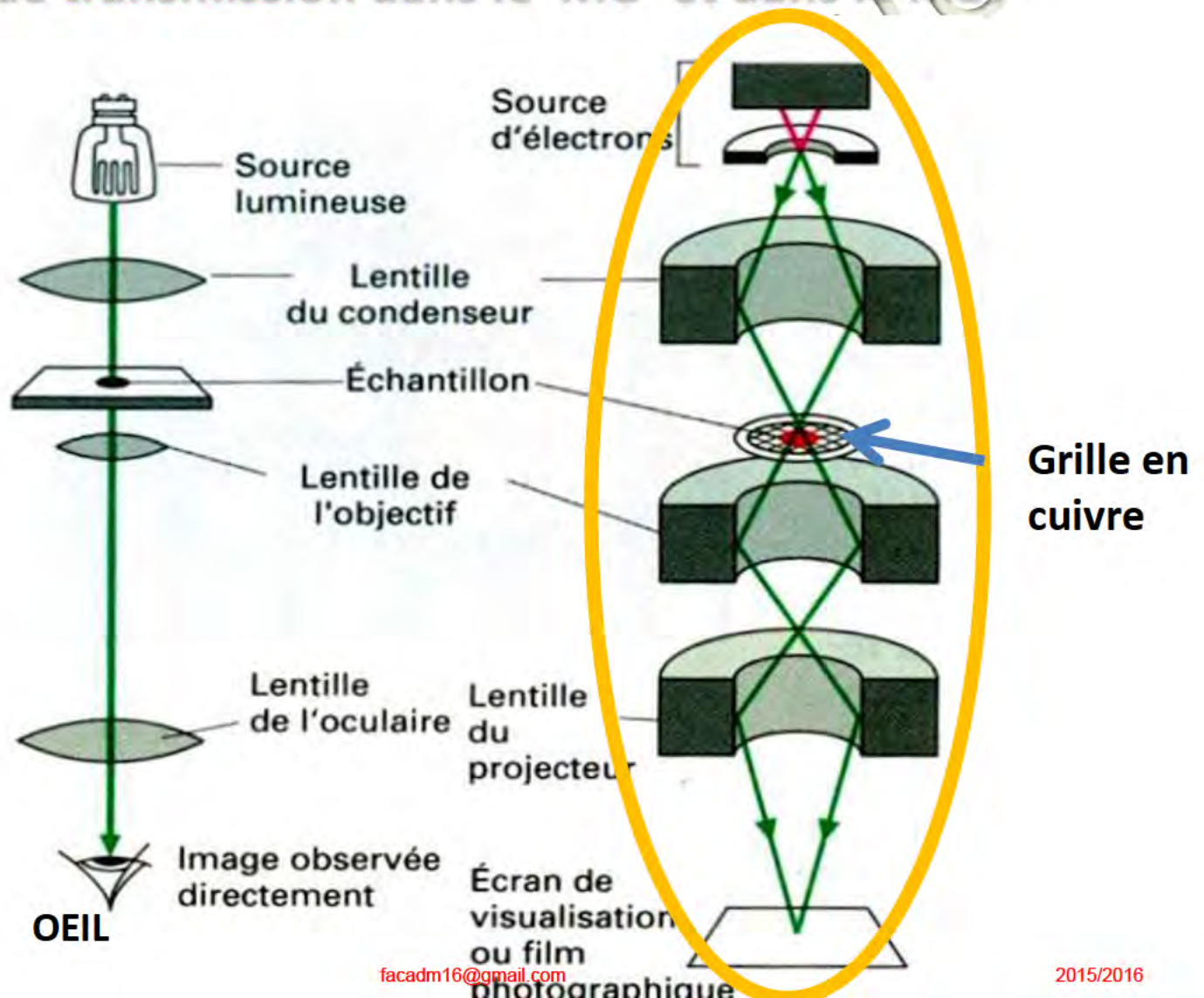
**Objectif 1 :** Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET).

## Principe de **transmission** des électrons



**Objectif 1 :** Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET).

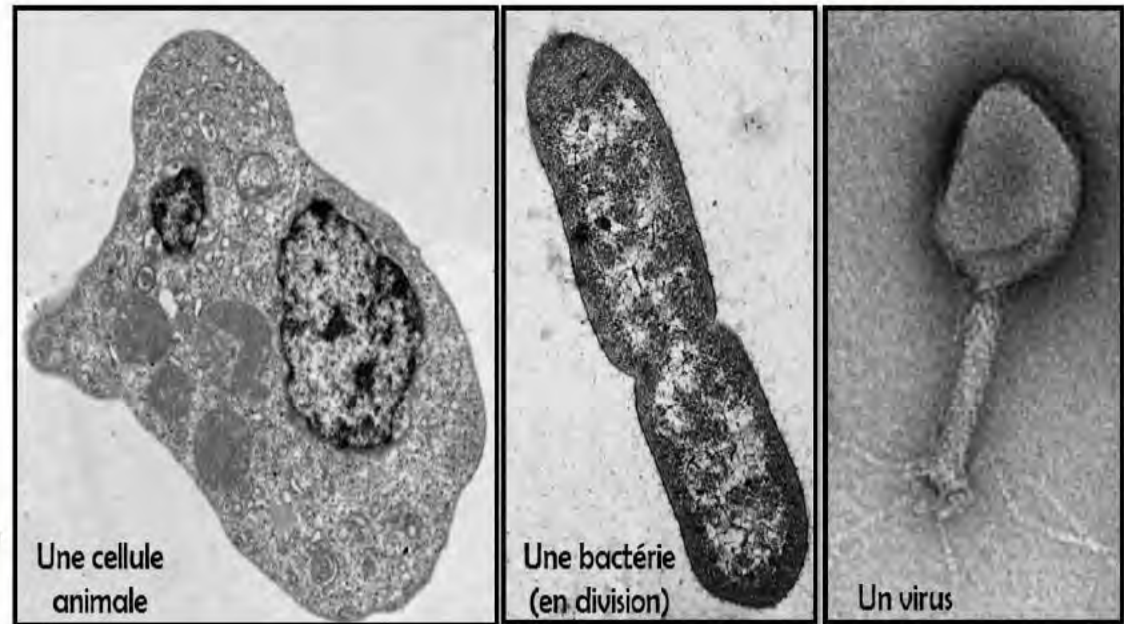
**Principe de **transmission** dans le MO et dans le MET**



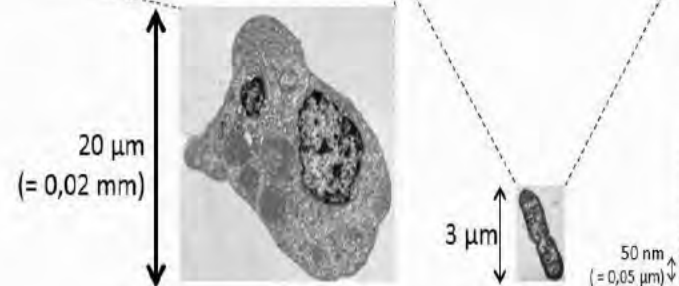


## Objectif 2 : Déterminer les domaines de son utilisation.

**Observation au  
MET à fort  
grossissement**



**Observation à  
faible  
grossissement**



## Objectif 2 : Déterminer les domaines d' utilisation du MET

- Un pouvoir de résolution de **0,2 nm ( 2 Å )** et même jusqu'à 10 Å pour certains MET .
- A permis de découvrir **l'ultrastructure** de la cellule révélant , avec précision l'existence d'organites cellulaires : noyau , mitochondries , lysosomes , vacuoles , vésicules , appareil de golgi , RE , ribosomes , centrioles , cytosquelette, chloroplastes .



## Objectif 2 : Déterminer les domaines d'utilisation du MET

### Ultrastructure d'un monocyte sanguin

Zones claires

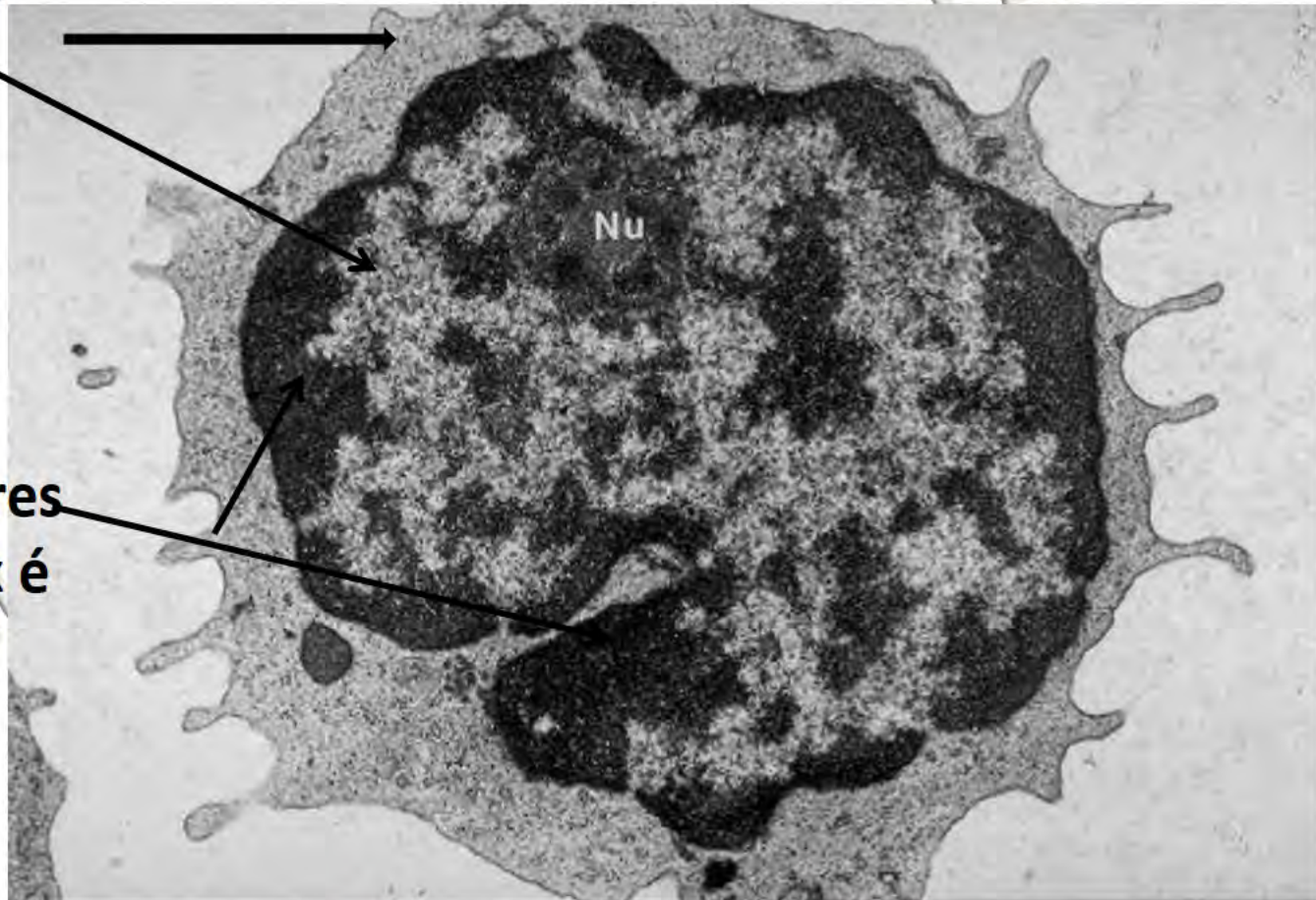


é transmis

Zones sombres  
opaques aux é



é arrêtés

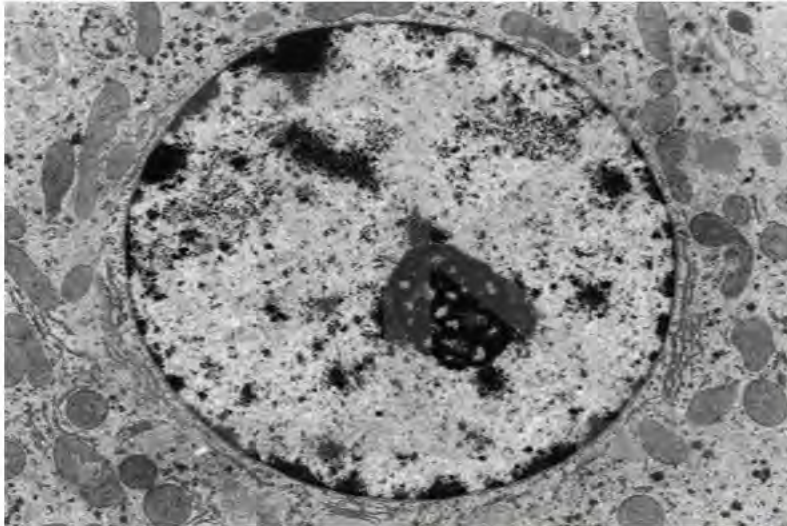


**Contraste positif**

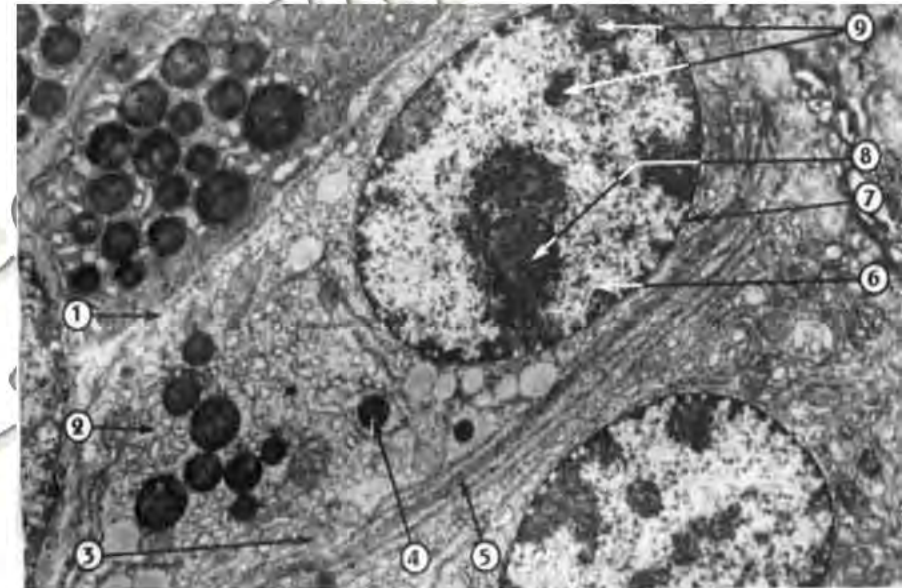


## Objectif 2 : Déterminer les domaines d'utilisation du MET

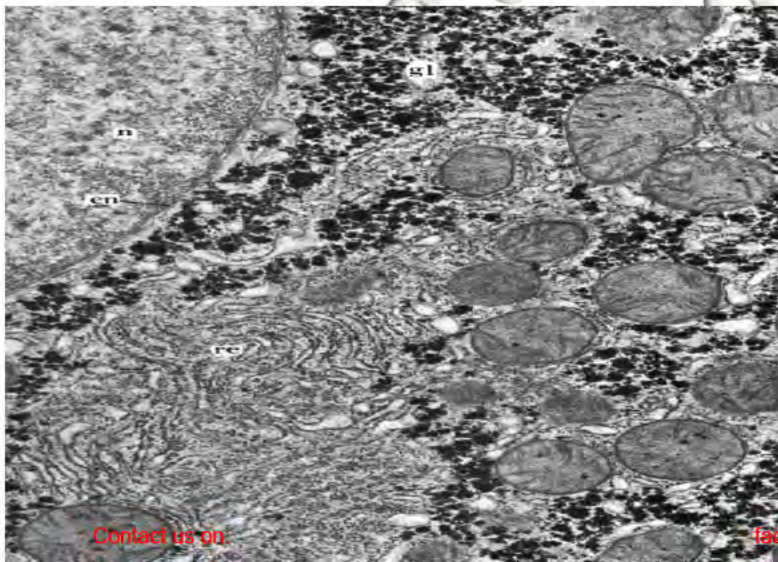
### Ultra structure d'une portion de cellule glandulaire



### Ultra structure du pancréas exocrine



### Ultra structure d'une portion de cellule hépatique





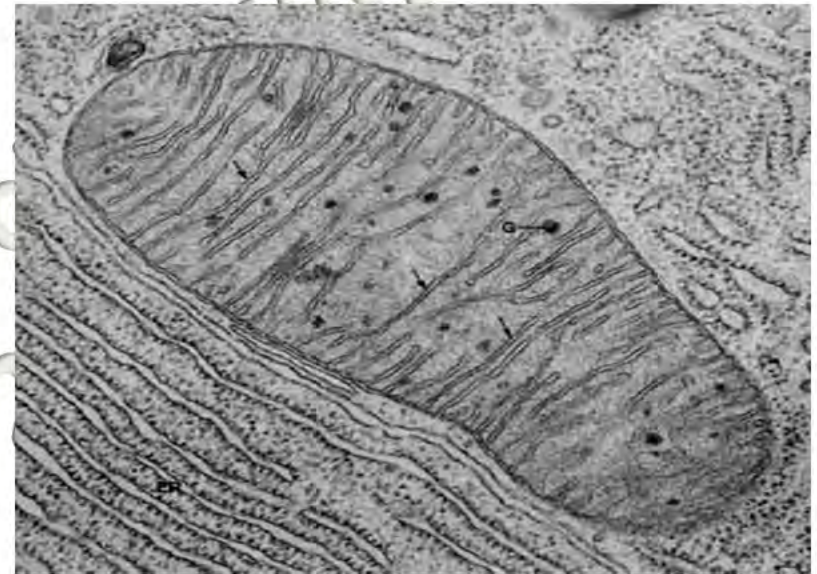
## Objectif 2 : Déterminer les domaines d'utilisation du MET

### Observation de détail plus fin à plus fort grossissement du MET

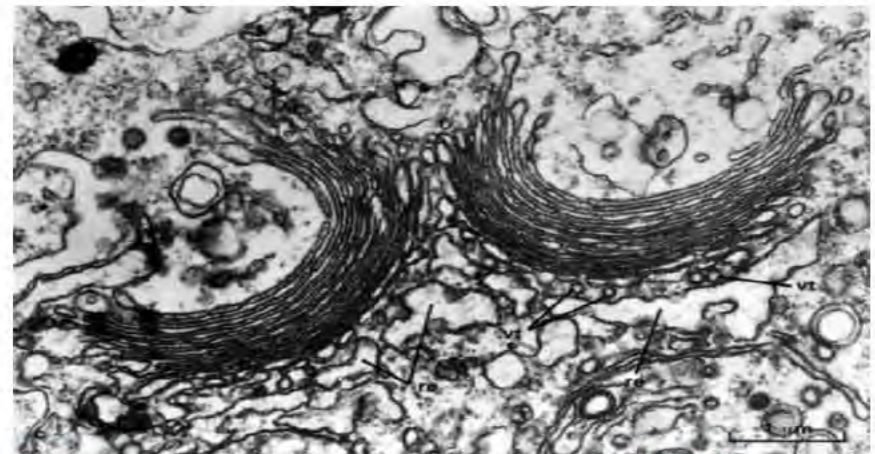
Ultra structure de la membrane plasmique du globule rouge



Ultra structure de mitochondrie / REG



Ultra structure de l'appareil de GOLGI



**Objectif 3** : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de sa caractérisation **ultra structurale** (technique des coupes minces et contraste positif) .

La Technique des coupes minces + contraste positif /  
Technique cytologique p. 29

**But** : Décrire **finement** les structures intracellulaires :

Donc réaliser une **étude ultrastructurale**

**Principe** : réaliser des **coupes ultrafines** permissives aux faisceaux d'électrons et aux sels de métaux lourds .



**Objectif 3** : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de sa caractérisation **ultra structurale** (technique des coupes minces et contraste positif) .

### **Les étapes de la technique de coupes minces**

Le principe et le procédé sont les mêmes que pour la technique histologique , la différence est dans les **produits** et les **outils** utilisés .

- Fixation double aux aldéhydes + tetroxide d'osmium .
- Déshydratation à l'alcool + solvant de la résine
- Inclusion / imprégnation à la **résine**
- Coupes **ultrafines de 300–600Å** sur **Ultramicrotome**
- Coupes étalées sur **grille** métallique(en cuivre)
- **Contraste** aux **sels de métaux lourds** , tel l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb ...
- Observation en **noir et blanc**

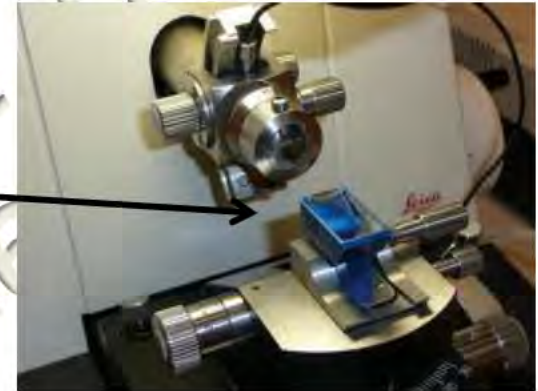
# Microtomisation



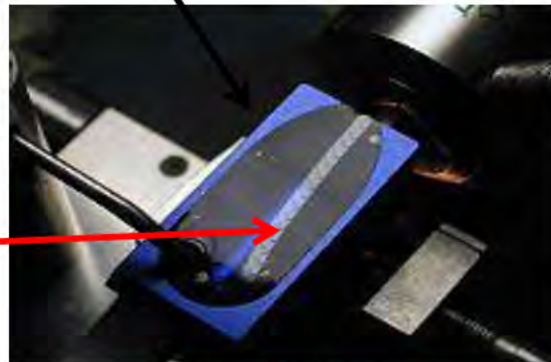
Ultra microtome



Blocs de résine  
+ échantillon

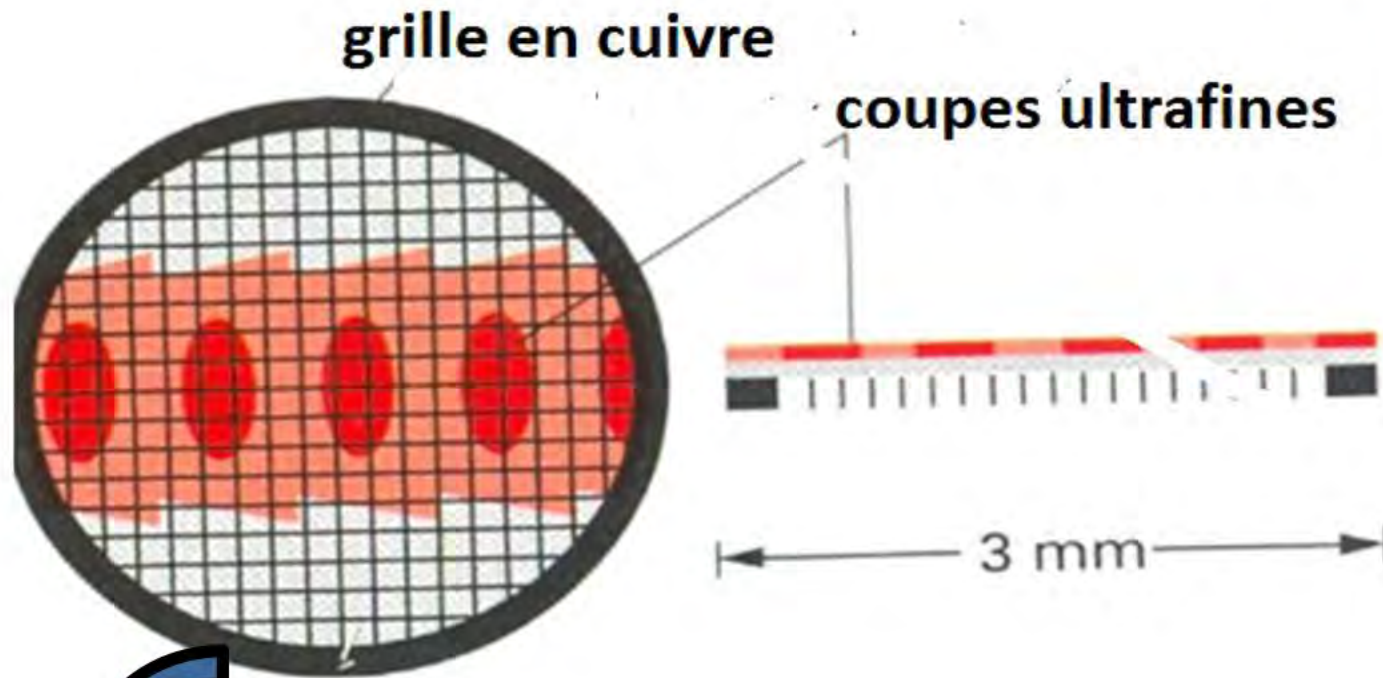


Coupes  
ultrafines de  
500 Å





# Récupération des coupes sur grille



**Contraste aux sels de métaux lourds**

ou **Contraste positif** ( contrastes d'intensités entre noir et blanc )

**Objectif 4** : Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive, coloration négative, autoradiographie) .

## Les procédés de contraste électronique

**A - Le contraste (coloration) positif** : ( aller à diapo 50 -51 -52)

Les atomes majeurs de la matière biologique sont transparents aux électrons d'où la nécessité d'utiliser des **sels de métaux lourds** ; l' **acétate d'Uranyl** , **Citrate de Plomb** .

**B - Le contraste (coloration) négatif** :

Le **contraste négatif** permet d'assombrir le fond sans colorer l'objet lui-même  
Les structures apparaissent en « **négatif** » en clair sur fond sombre

**C - L'autoradiographie** :

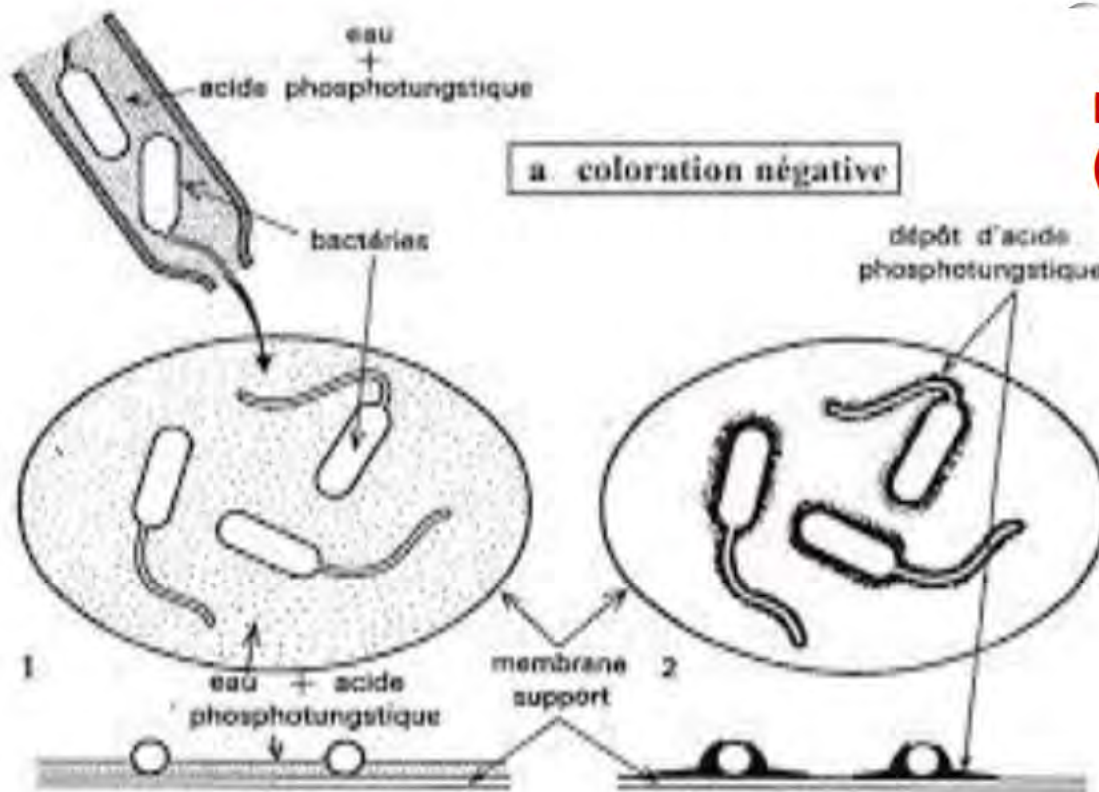
**Suivi de molécules** intracellulaires ( protéines , acides nucléiques ...)  
**marquées** par des isotopes radioactifs tel : le C 14 , H 3 . Connaitre leur emplacement et leur déplacement au cours du temps .



## Objectif 4 : Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive, coloration négative, autoradiographie)

### B - La technique de coloration négative

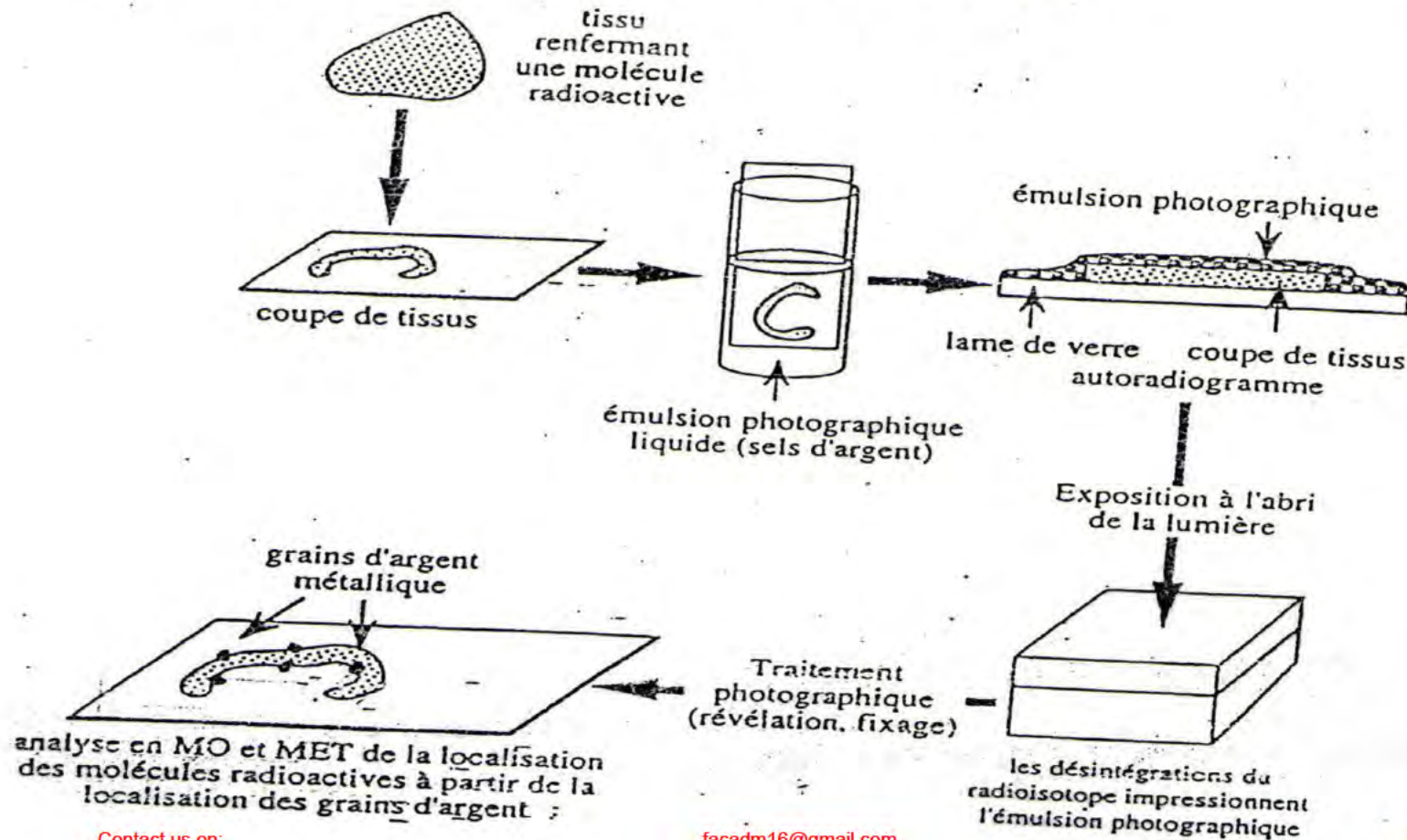
Principe du contraste négatif  
(p.32)



# Objectif 4 : Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive, coloration négative, autoradiographie)

## C – La technique d'autoradiographie

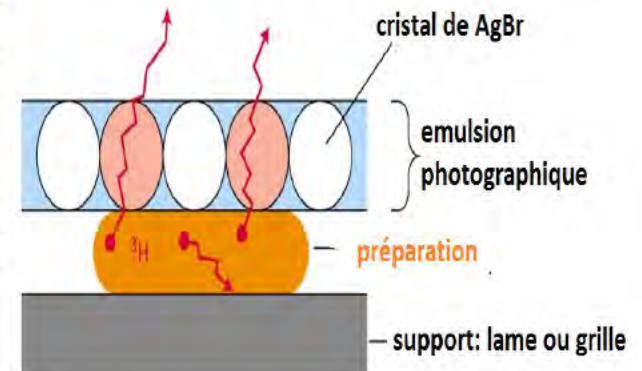
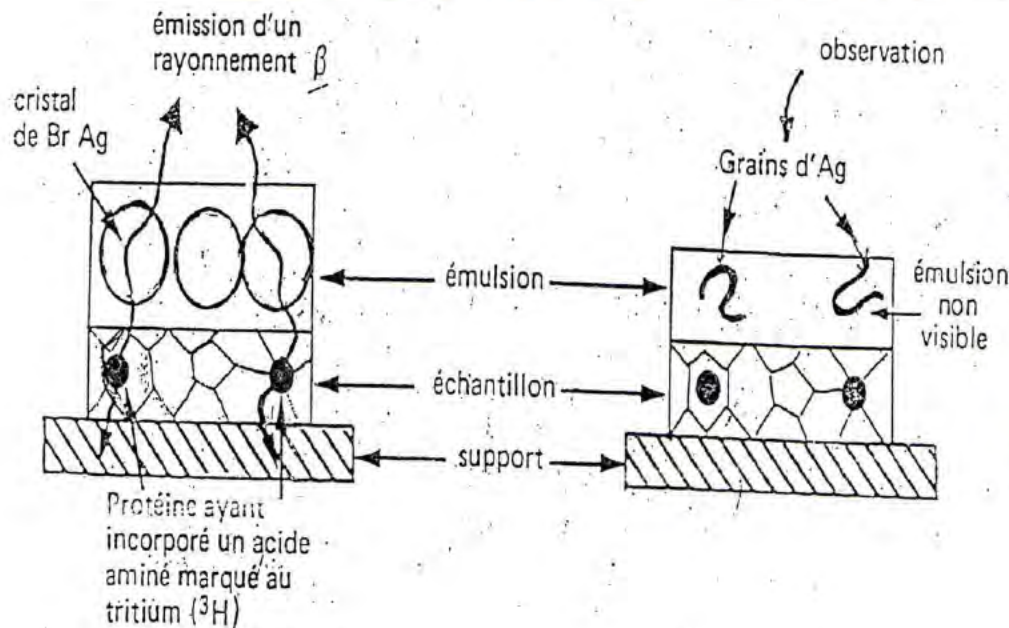
### Procédé de la technique d'autoradiographie





## Objectif 4 : Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive, coloration négative, autoradiographie)

### C – La technique d'autoradiographie



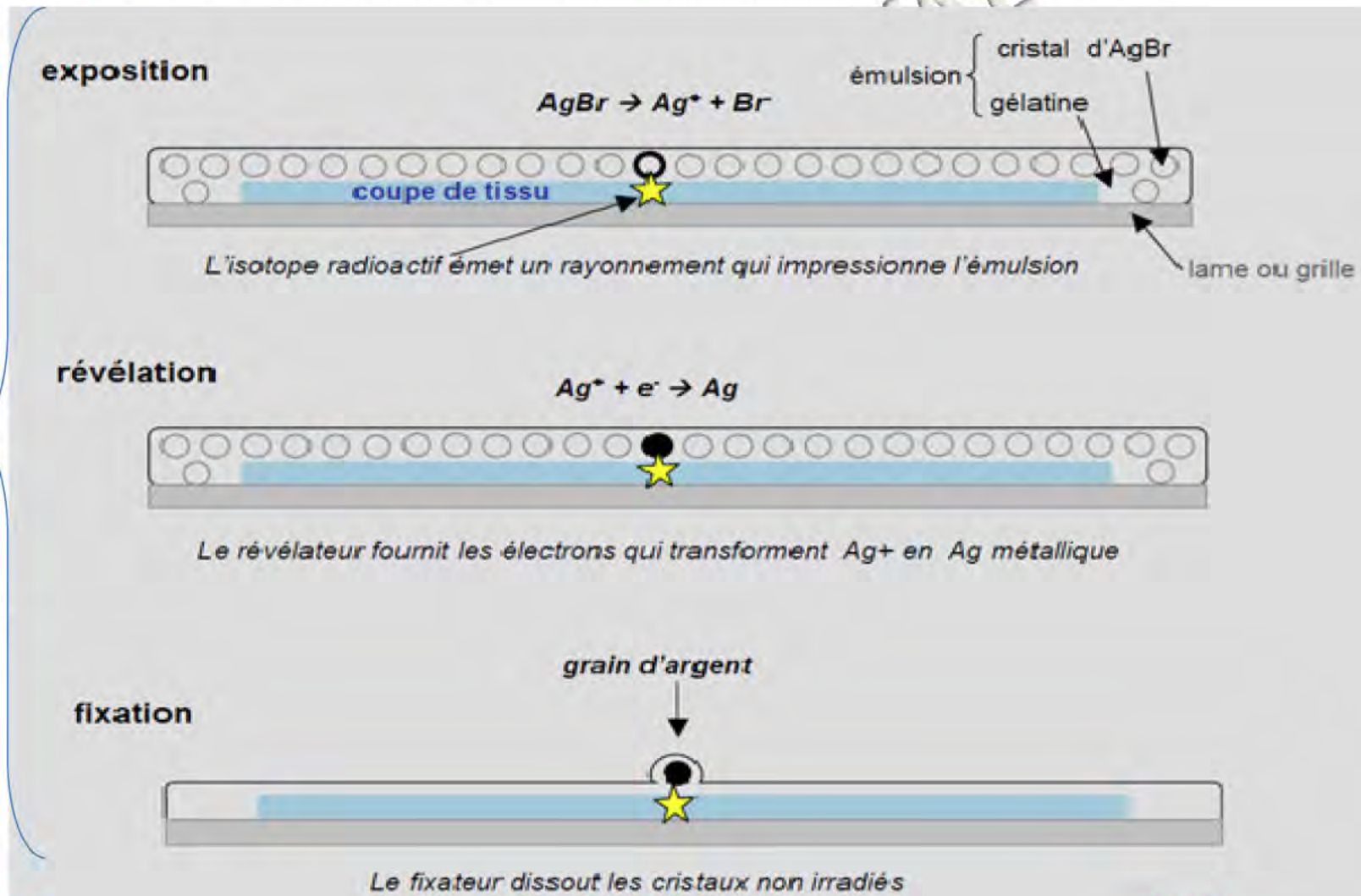
Les sels de Bromures d'argent (BrAg) contenus dans l'émulsion sont réduits par le rayonnement radioactif et apparaissent sous forme de grains noirs .

Les **grains d'argent** indiquent les **régions** où sont localisées les molécules ayant incorporé les précurseurs radioactifs.

# Objectif 4 : Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive, coloration négative, autoradiographie)

## C – La technique d'autoradiographie

En  
chambre  
noire





**Objectif 5 :** Indiquer l'apport (**but**) de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse **morphologique** d'un échantillon

**A** – le contraste (coloration) positif : diapos 46 -47 -48

**But** : Décrire **finement** les structures intracellulaires

Donc réaliser une **étude ultra structurale**

**Objectif 5 :** Indiquer l'apport (**but**) de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

**B** - Technique de coloration négative

**BUT :**

**Description morphologique** (morphologie externe) de macromolécules ou d'organites (ex : les ribosomes), de virus, bactérie, mais **après isolement**.

**Architecture moléculaire** des éléments du cytosquelette (microtubules, microfilament d'actine..), de la chromatine, des pores nucléaires, mais **après isolement**.



Free database on www.la-faculte.net published for NON-lucrative use

# Objectif 5 : Indiquer l'apport de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

## B- Contraste par coloration négative

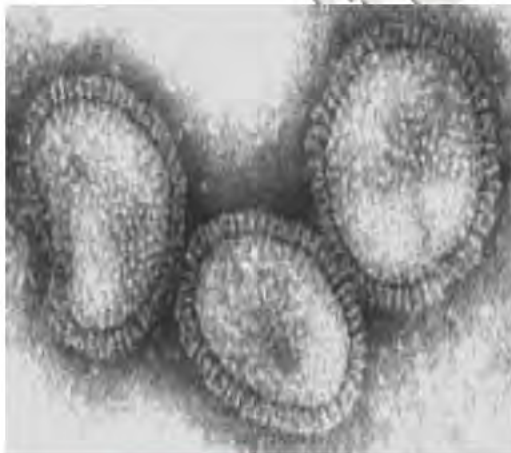
**Morphologie externe de virus** isolés à partir de cellules infectées



Bactériophages



Virus Ebola



Virus grippal

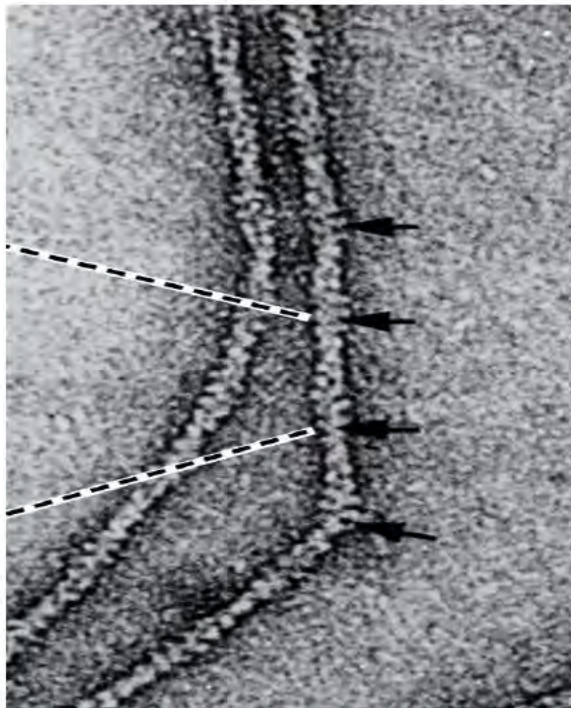
Virus de la Mosaïque du tabac



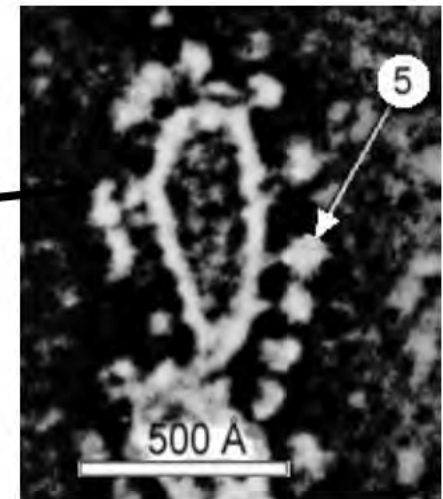
# Objectif 5 : Indiquer l'apport de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

## B - Contraste par coloration négative

**Architecture  
moléculaire des  
Microfilaments d'actine**



**Morphologie externe  
des ATPosomes de la  
crête mitochondriale**



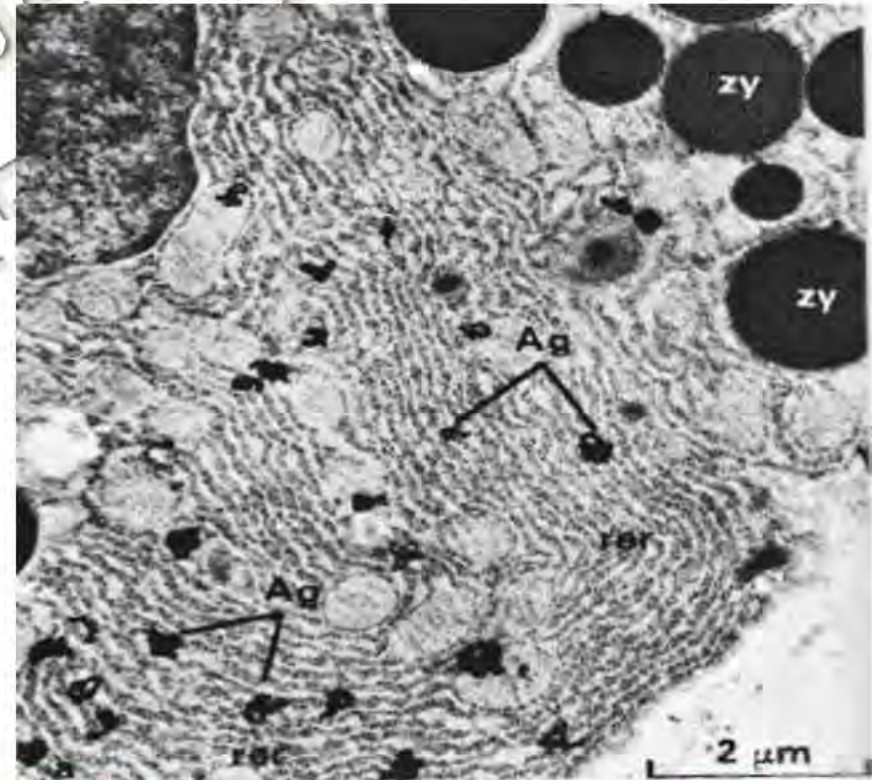
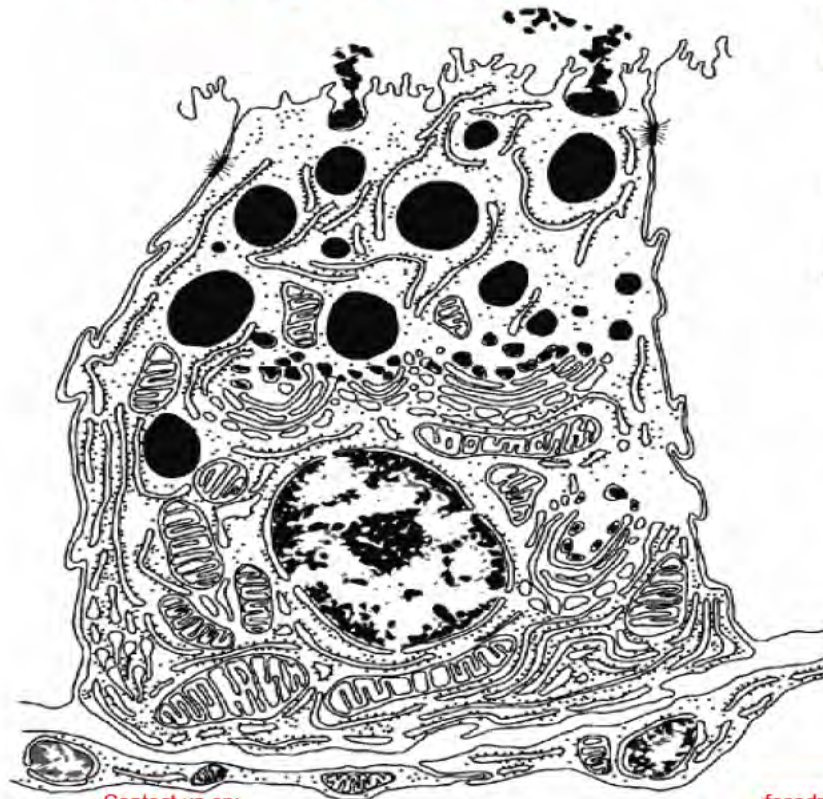


**Objectif 5 :** Indiquer l'apport (but) de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

## **C - La Technique d'autoradiographie**

**But** : Etude de la Cinétique d'un métabolisme cellulaire

Marquage à la **leucine radioactive** et suivi des **protéines** néo synthétisées dans la **cellule pancréatique**

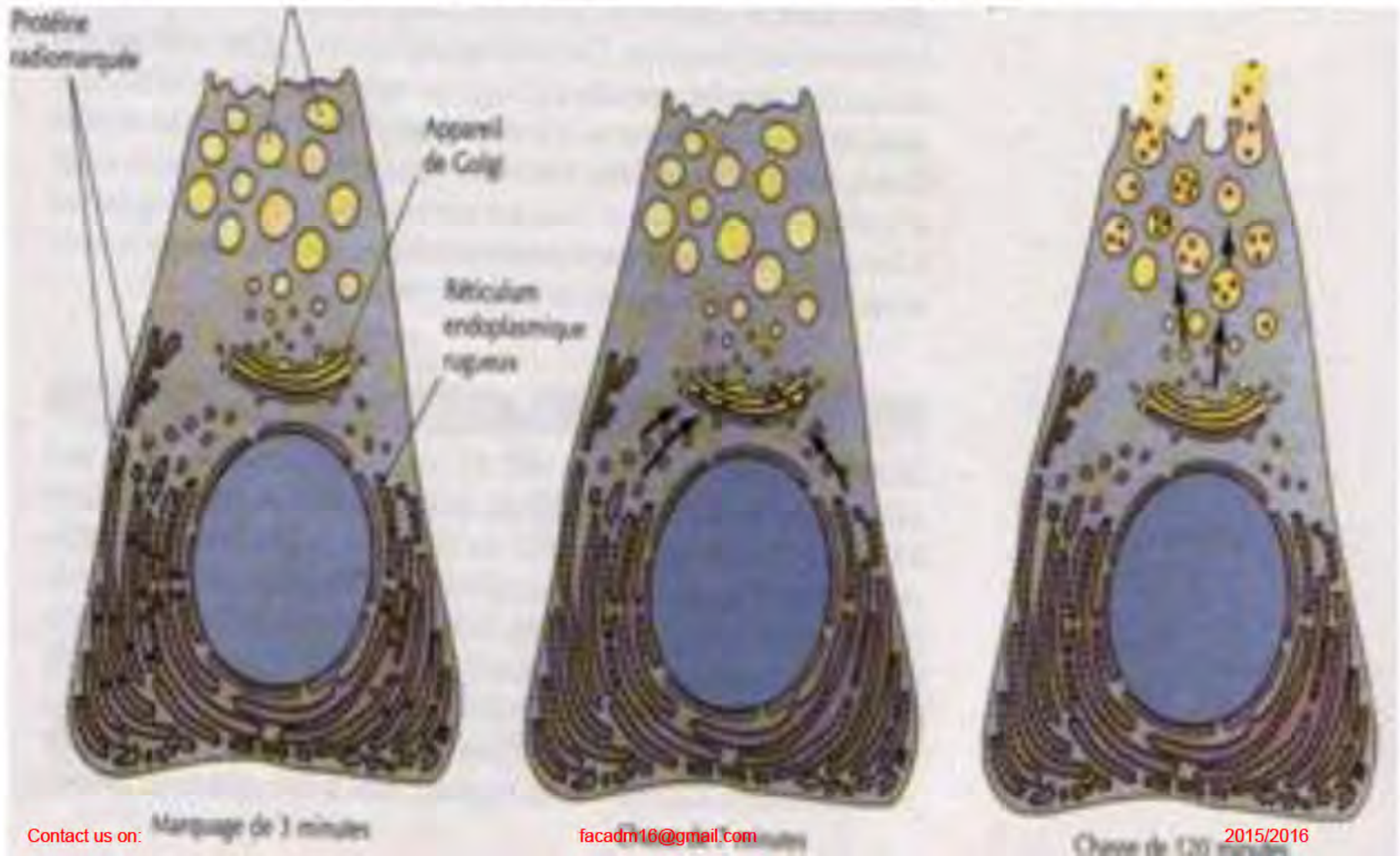




**Objectif 5 :** Indiquer l'apport de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

## **C - La technique d'autoradiographie**

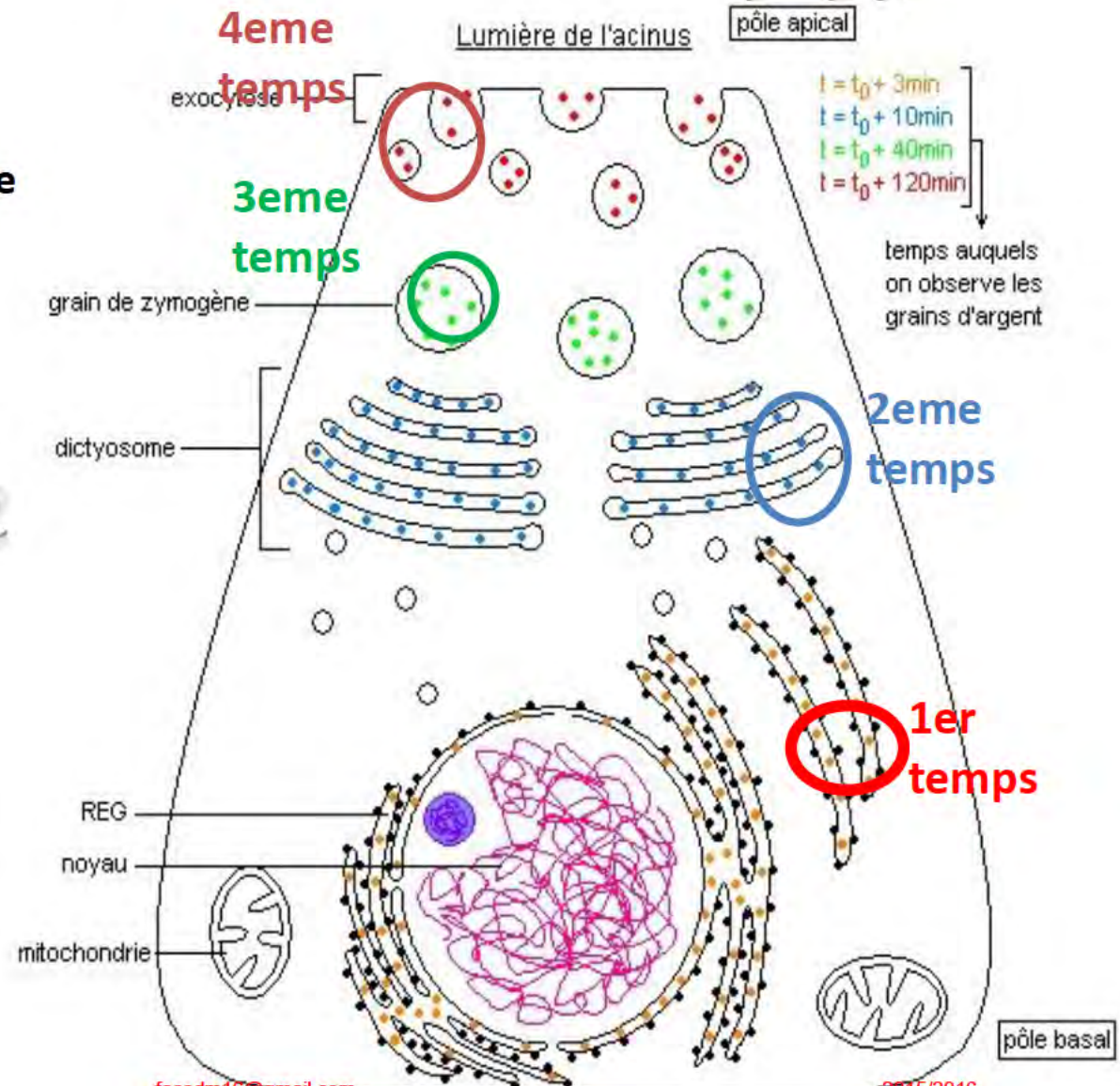
**Cinétique de la synthèse et de l'emballage des produits de sécrétion (protéines)**





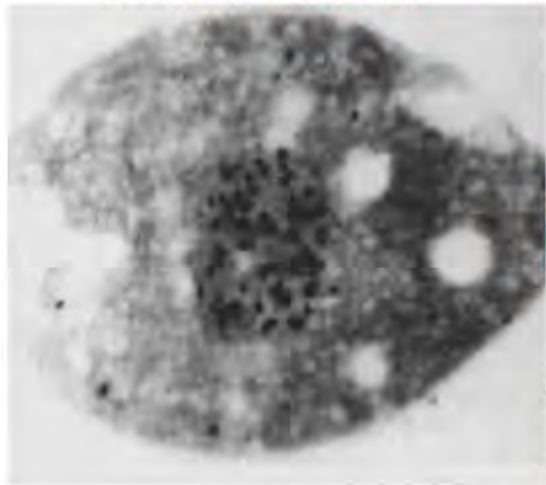
# Objectif 5 : Indiquer l'apport de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

**Cinétique de la synthèse et de l'emballage des produits de sécrétion (protéines)**

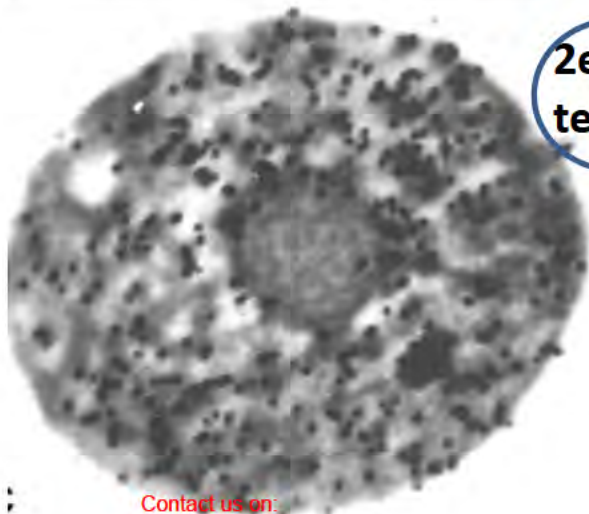


## Objectif 5 : Indiquer l'apport de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon

Marquage à l'**uracile H 3**  
(**précurseur radioactif**) et  
suivi de **l'ARN m**

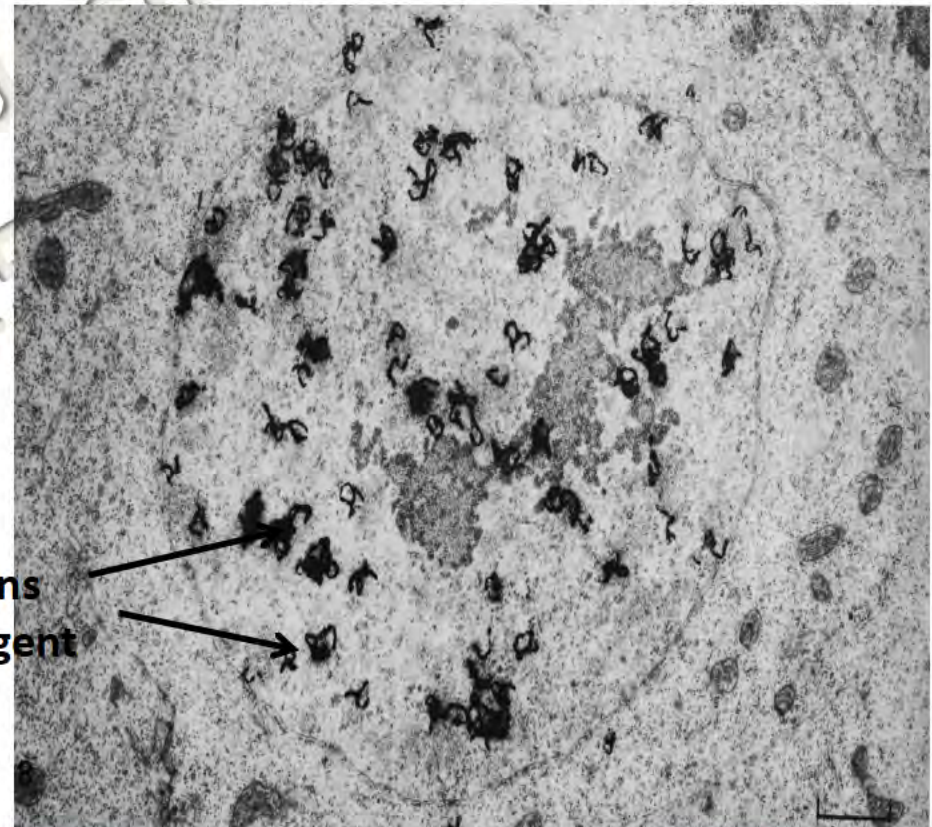


1<sup>er</sup>  
temps



2eme  
temps

Marquage à la **Thymine radioactive** et  
localisation de **l'ADN** dans le noyau



Grains  
d'argent



# Objectifs spécifiques

## B – Le microscope électronique à balayage

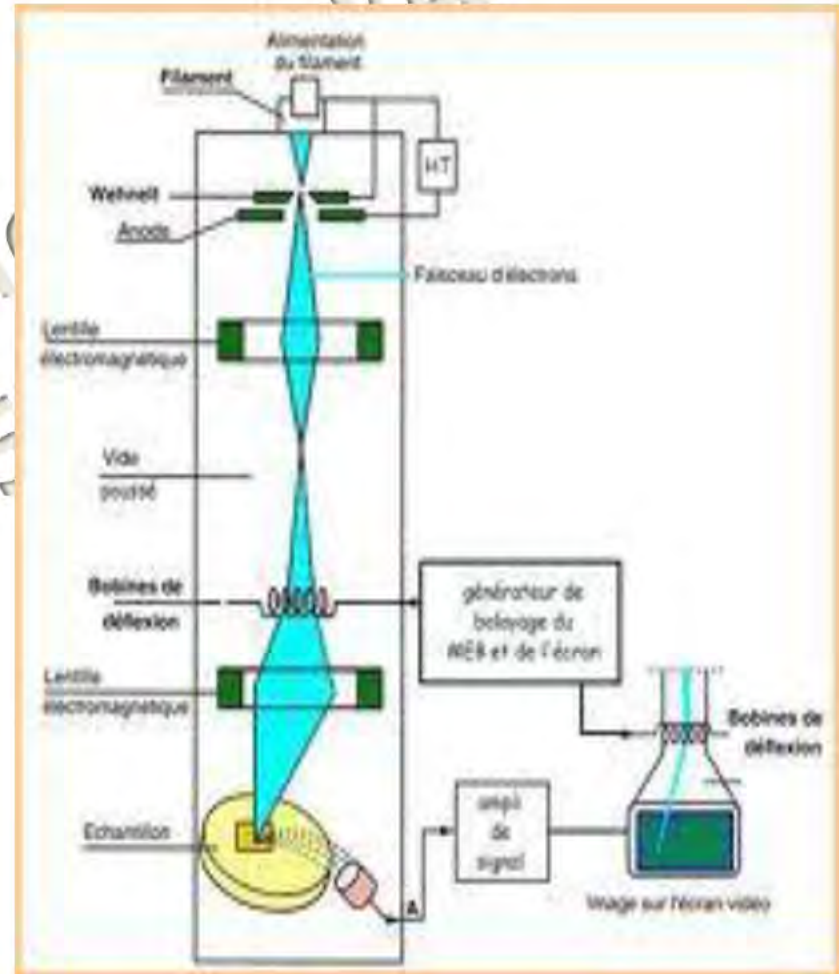
**Objectif 1 :** Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.

**Objectif 2 :** Déterminer les domaines de son utilisation.

**Objectif 3 :** Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique ).

# Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.

Principe de fonctionnement du MEB : **observation par réflexion**

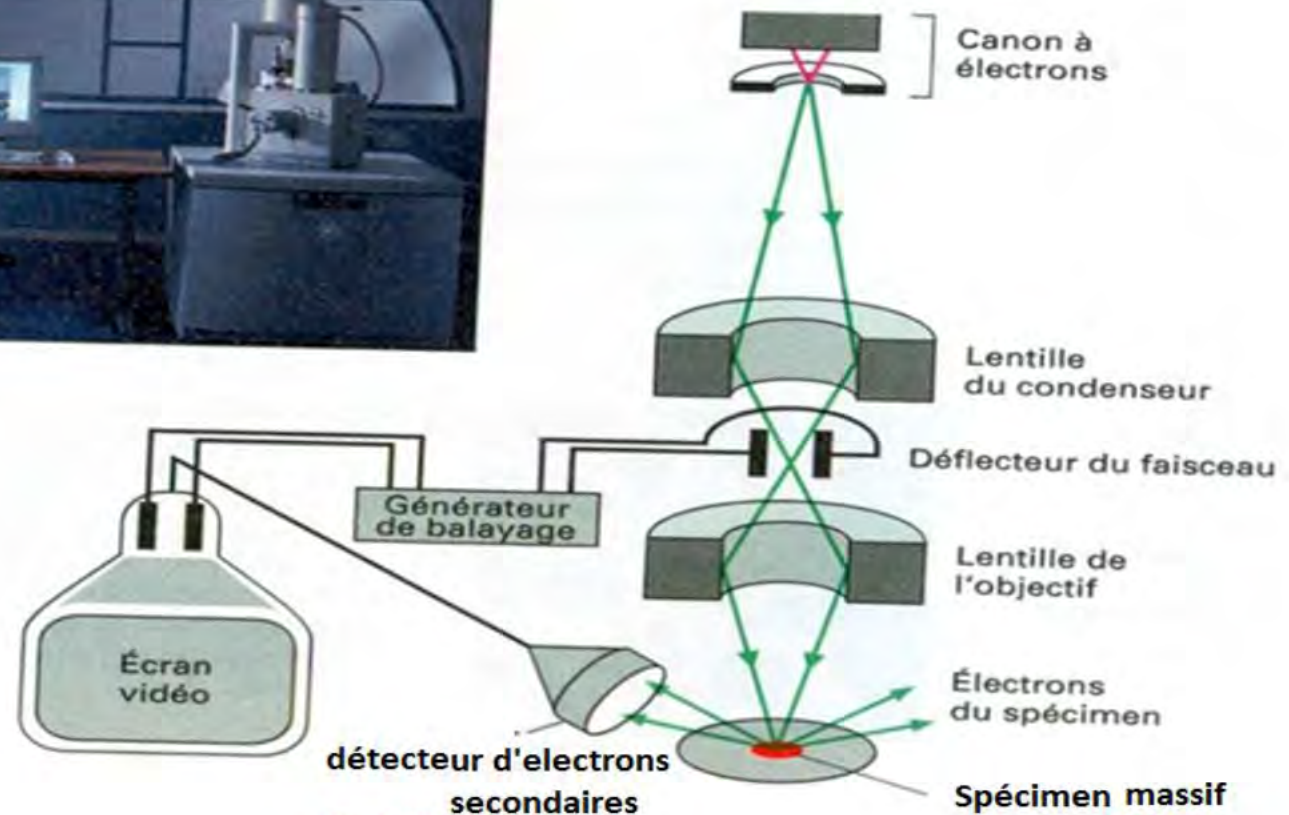
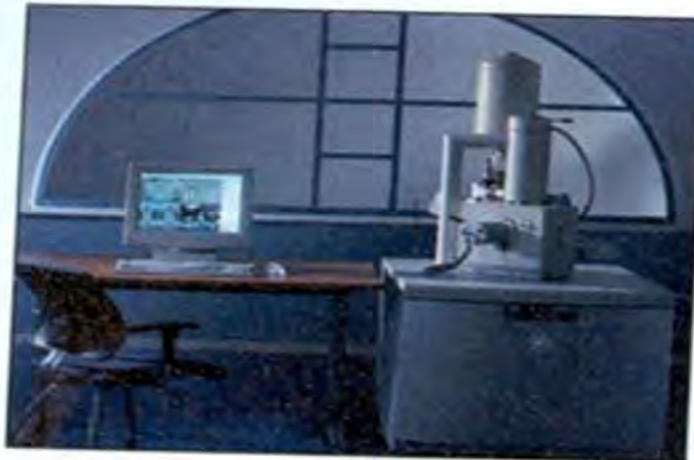




# Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.

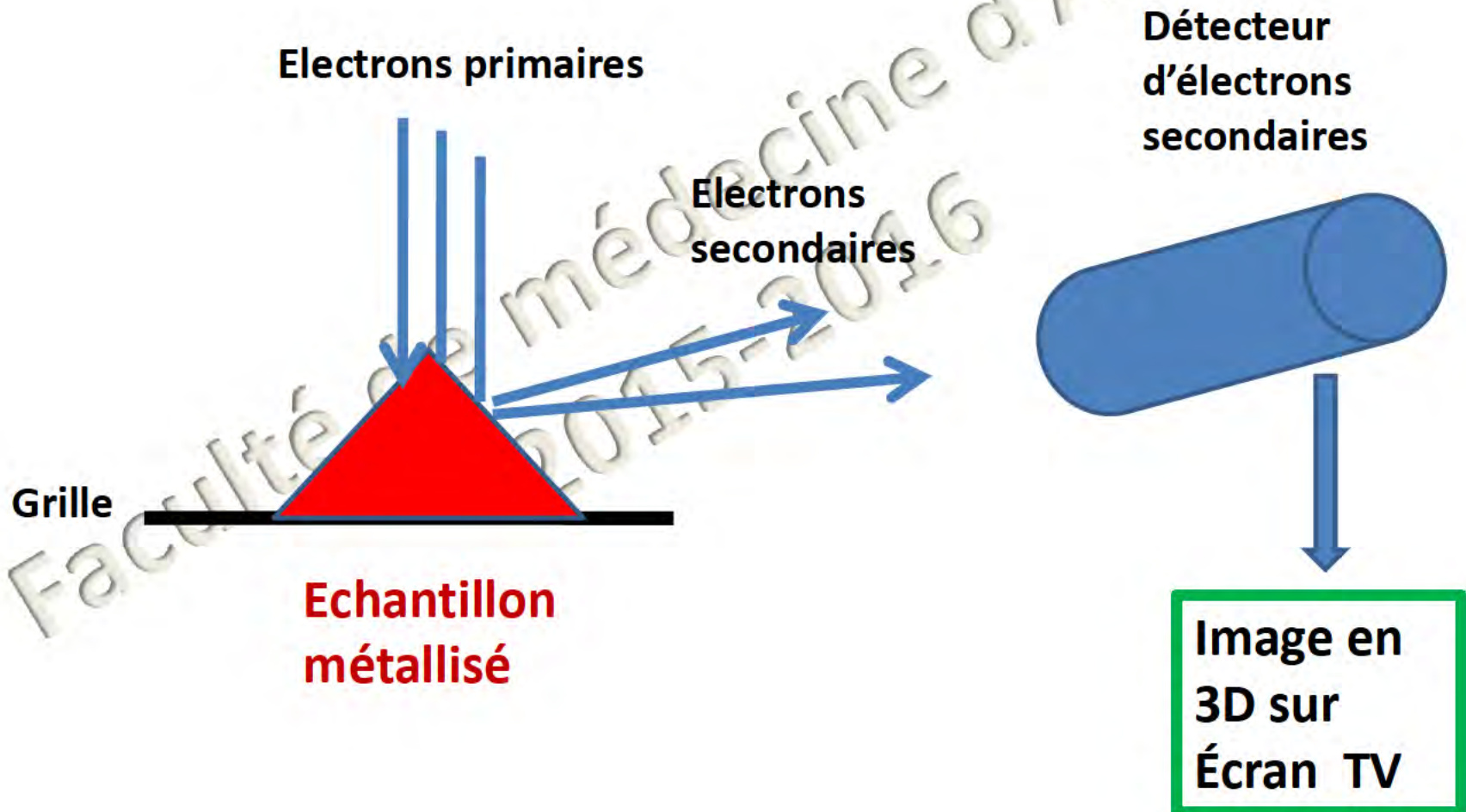
## L'observation par réflexion : système de balayage

MEB



**Objectif 1 :** Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.

## Principe de fonctionnement du MEB





**Objectif 2** : Déterminer les domaines d' utilisation du MEB .

## **La microscopie électronique à balayage**

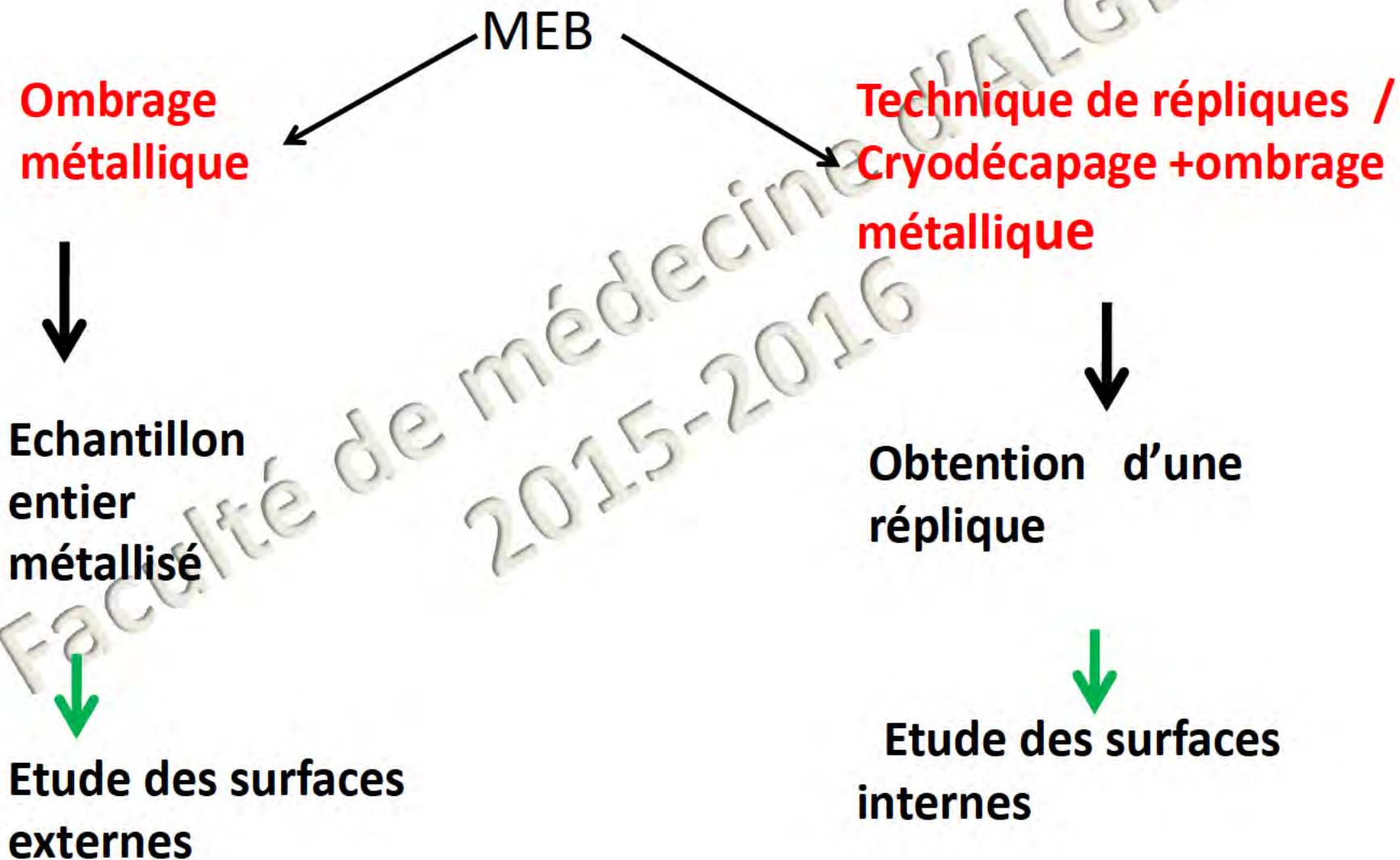
### **But :**

Etude morphologique en 3D :  
Révéler les surfaces externes ou internes

### **Principe :**

Contraste de la surface par **ombrage métallique** et son **balayage** par le faisceau d'électrons

## Objectif 2 : Déterminer les domaines d' utilisation du MEB .

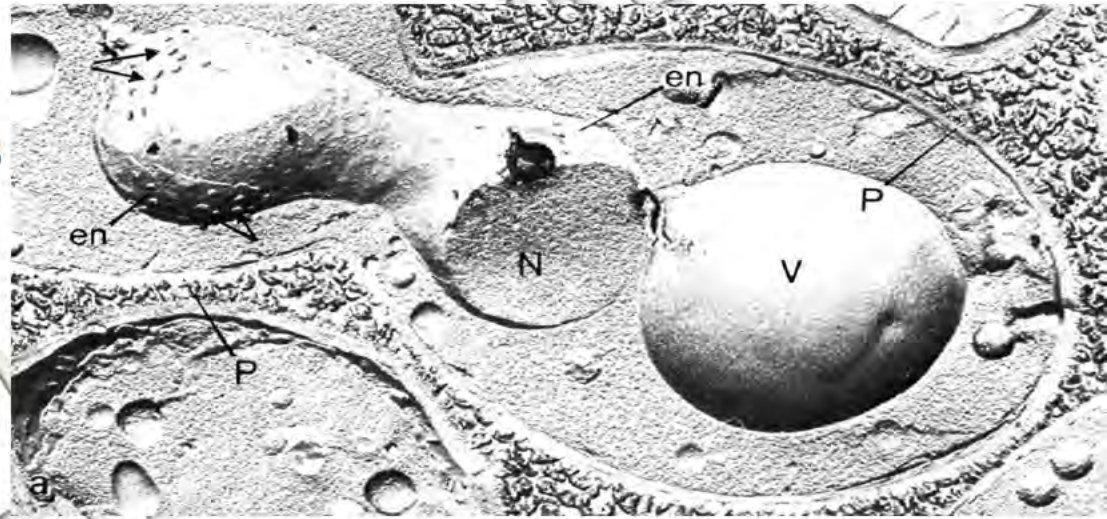




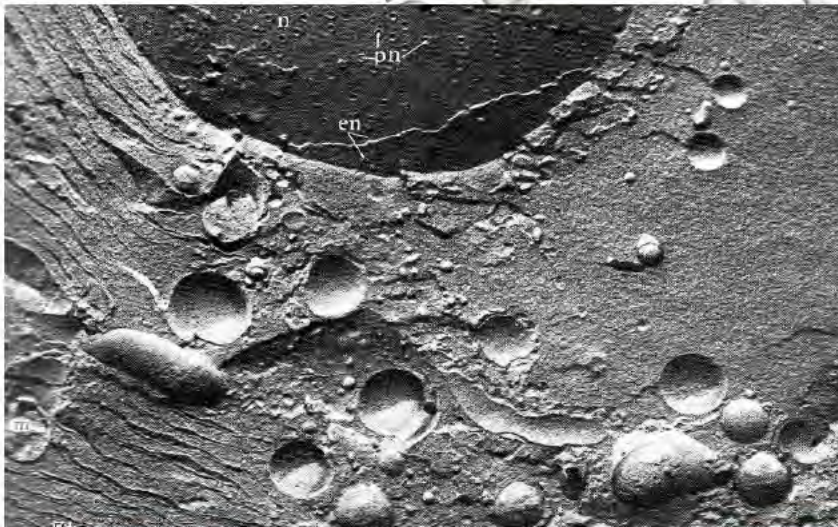
## Objectif 2 : Déterminer les domaines d' utilisation du MEB .

### 1 - Observation de répliques de **surfaces internes** après cryodécapage

Levure de bière au MEB



Réplique d'une  
portion de cellule  
hépatique

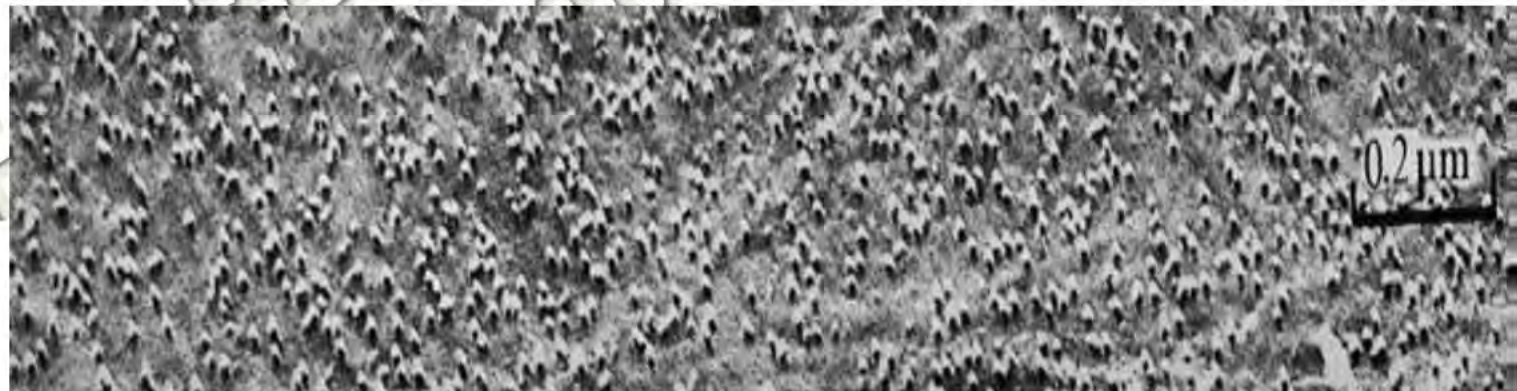




## Objectif 2 : Déterminer les domaines d'utilisation du MEB .

### Observation de réplique après cryodécapage

Réplique de la membrane plasmique (surface interne) mise en évidence de particules membranaires



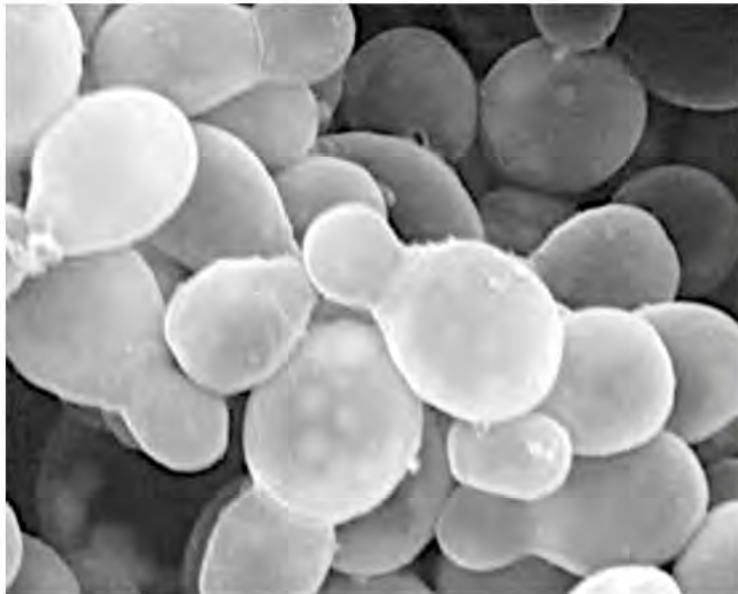


## Objectif 2 : Déterminer les domaines d' utilisation du MEB

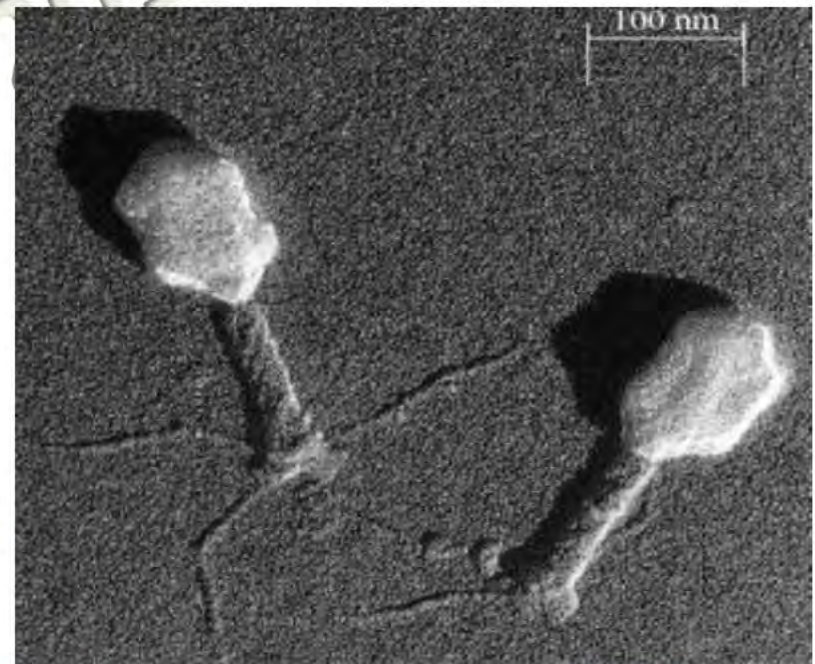
### 2 - Observation de **surfaces externes** d'échantillons entiers

Après ombrage métallique

Aspect en  
3 D



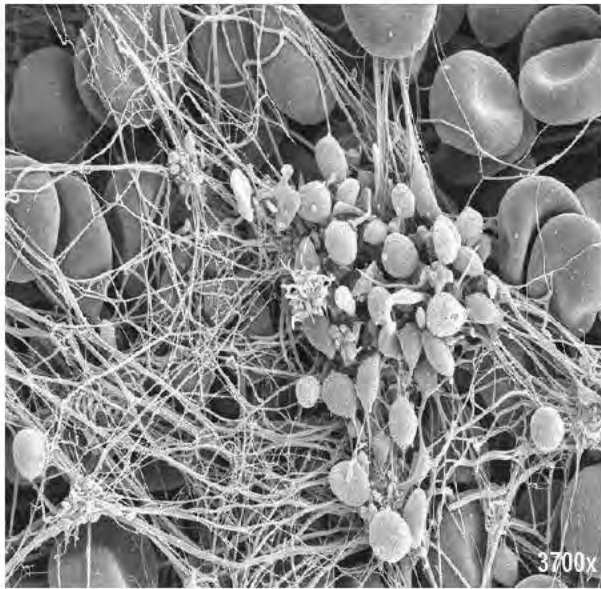
Levures de  
bière



Bactériophages  
en **relief**

## Objectif 2 : Déterminer les domaines d'utilisation du MEB

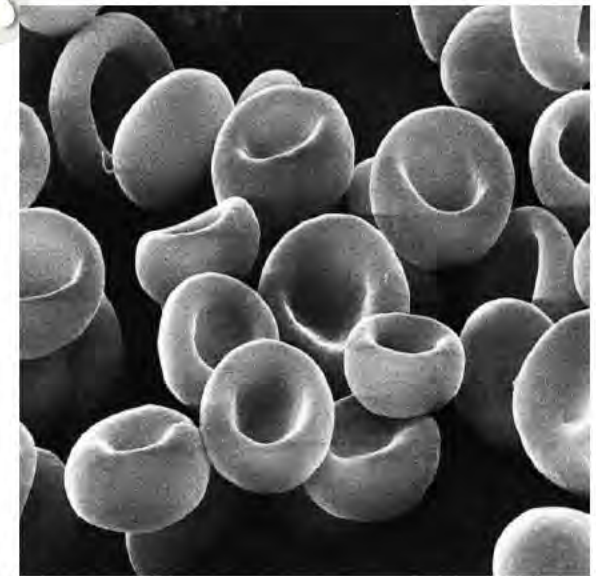
Observation de **surfaces externes** d'échantillons entiers



**Caillot sanguin**



**Chromosomes  
humains**

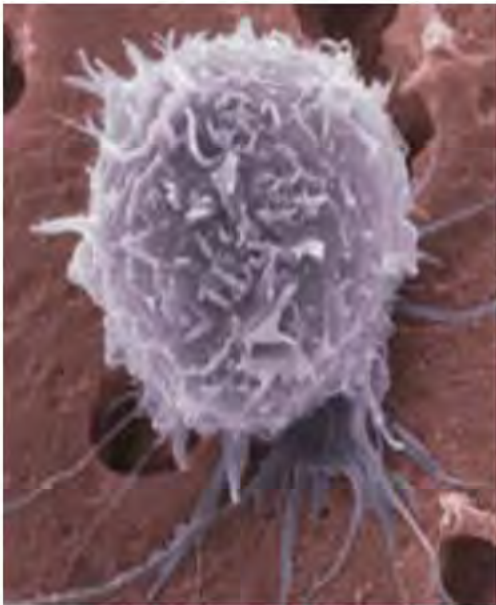


**Aspect biconcave des  
globules rouges**



## Objectif 2 : Déterminer les domaines d' utilisation du MEB

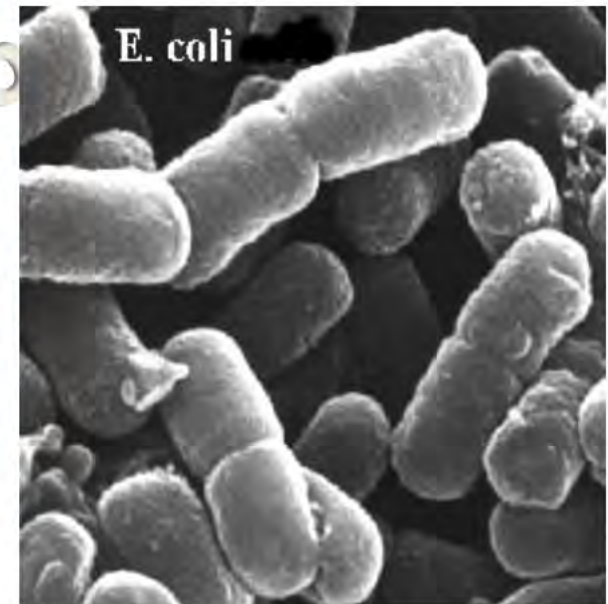
Observation de **surfaces externes** d'échantillons entiers



Cellule souche de  
moelle osseuse



Spermatozoïde  
perforant l'ovocyte



Bactérie E . COLI

**Objectif 3** : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique )

### **La technique de cryodécapage ou de réplique**

La technique de **cryodécapage** est généralement applicable au MEB et s'effectue comme suit :

La congélation de l'échantillon

la cryofracture

Le décapage

l'ombrage métallique

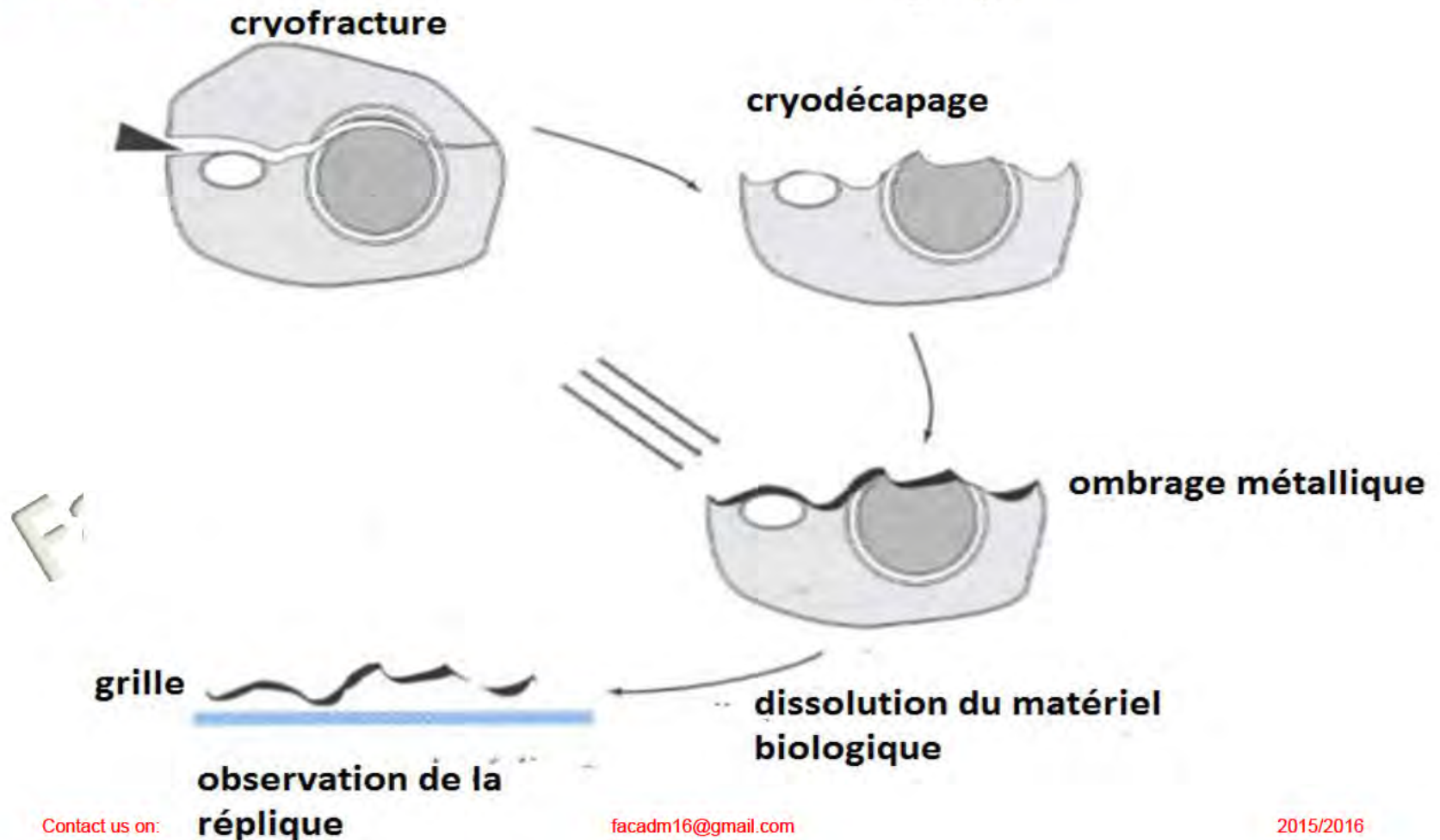
l'obtention de la réplique



Free database on www.la-faculte.net published for NON-lucrative use

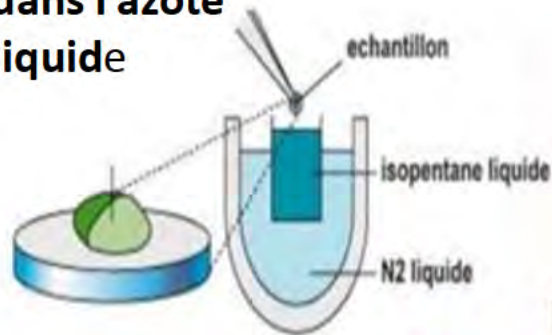
# Objectif 3 : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique )

## Principe de l' Obtention d'une réplique (moule) de la surface interne

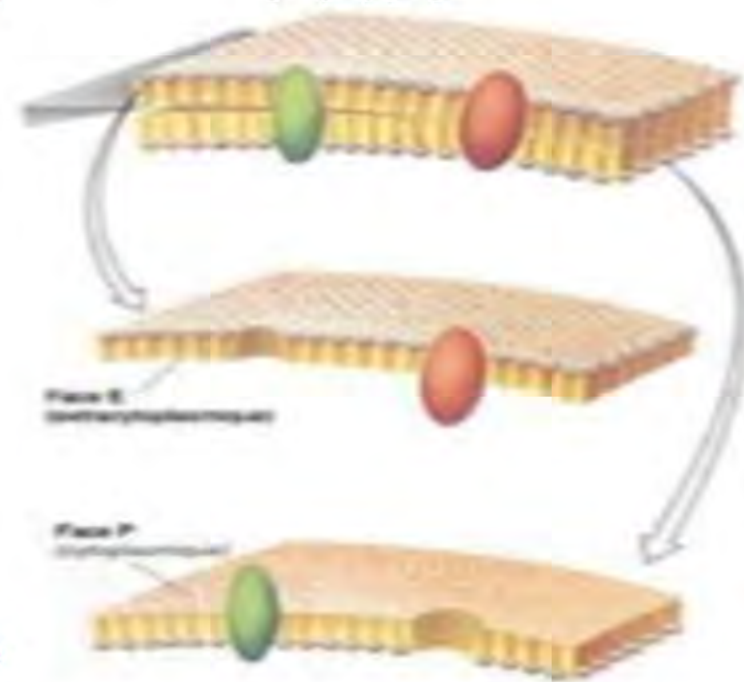


**Objectif 3 : Citer** les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique ) page 30 fascicule 1

**Congélation  
dans l'azote  
liquide**

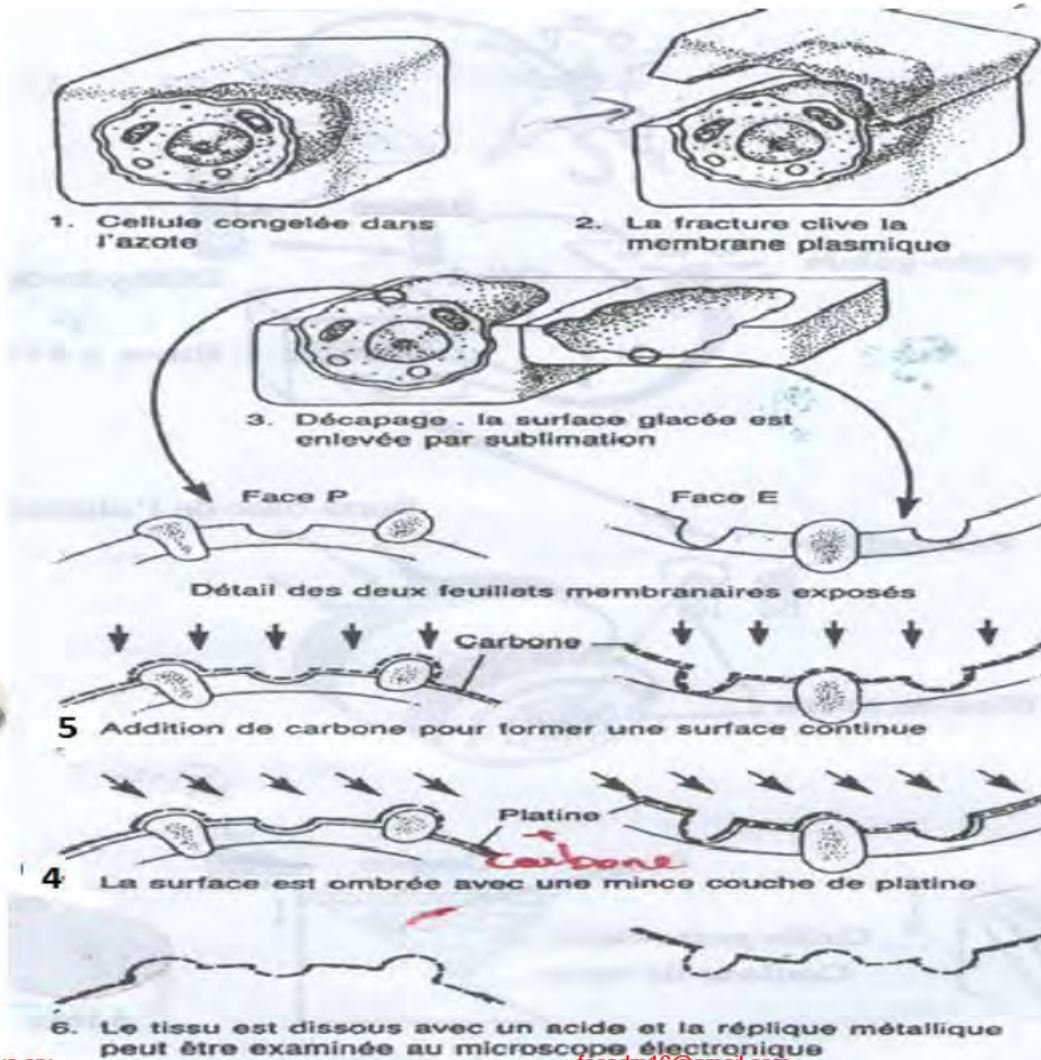


**Cryofracture**



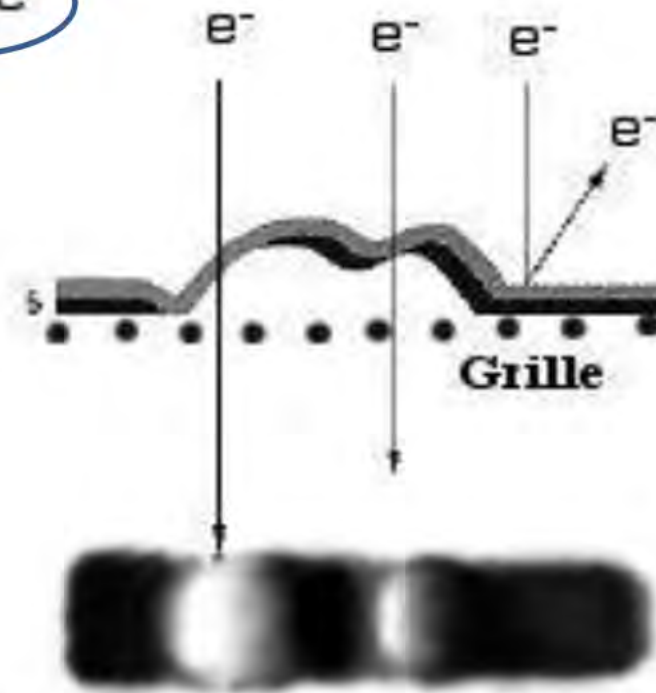
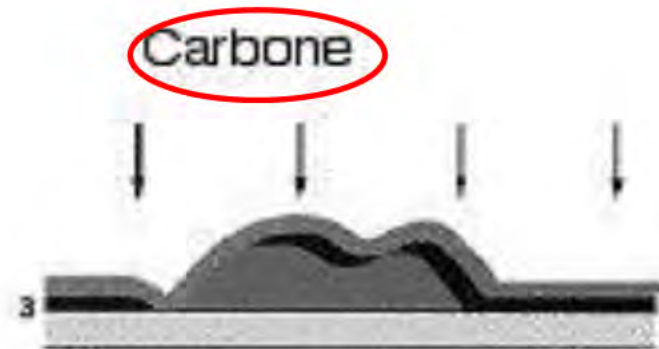
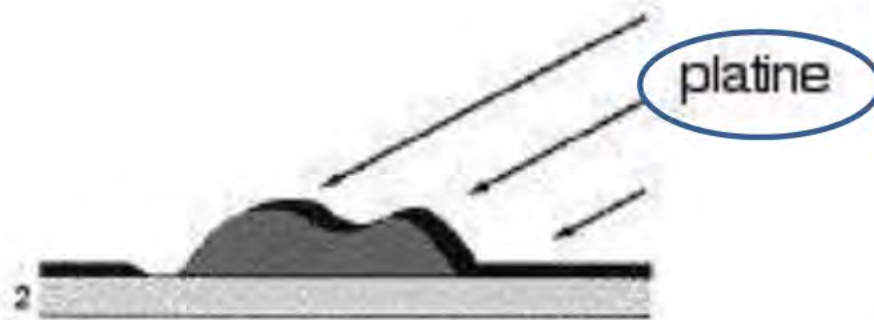
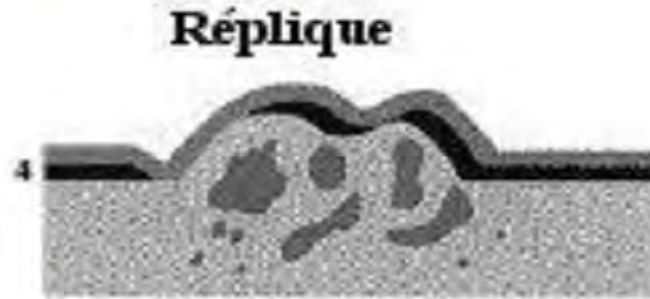
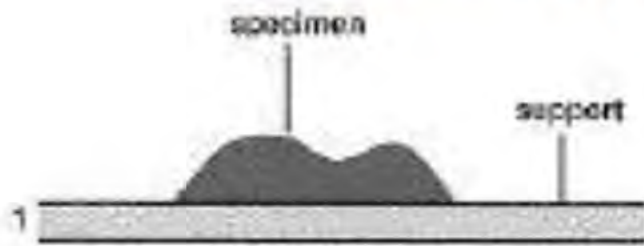


**Objectif 3 : Citer** les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de son analyse tridimensionnelle (la technique de cryodécapage / ombrage métallique ) page 30 fascicule 1



**Technique  
des  
répliques**

# L' Ombrage métallique



**Image observée sur l'écran  
du microscope électronique.**



## Objectifs spécifiques

**Objectif 1 :** Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

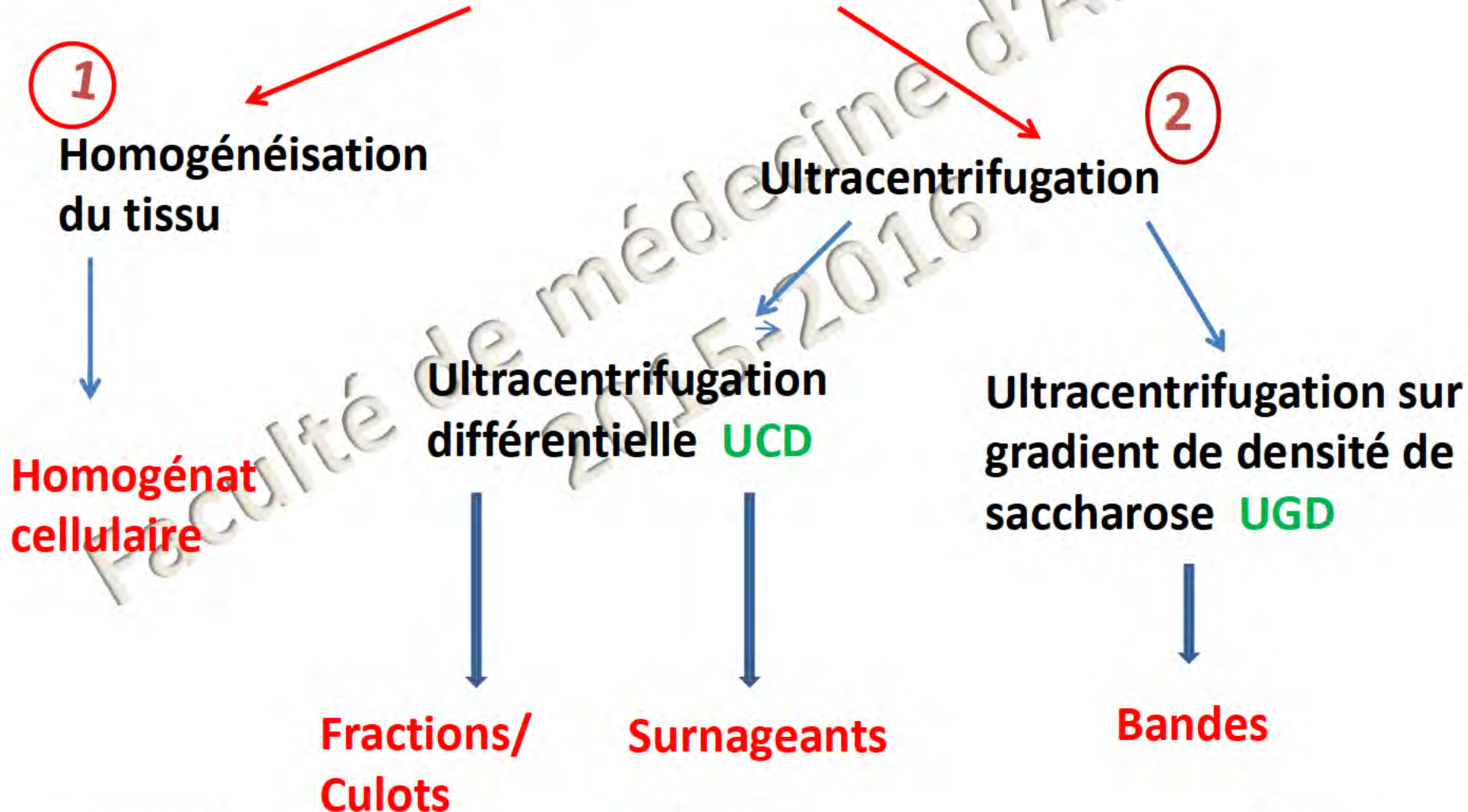
**Objectif 2 :** Lister les structures obtenues dans chaque culot après application d'une ultra-centrifugation différentielle (UCD).

**Objectif 3 :** Lister les structures recueillies à partir de chaque culot après application d'une ultra-centrifugation sur gradient de densité (UGD).

**Objectif 4 :** Indiquer les techniques de contraste et d'analyse applicables sur les structures isolées (contraste négatif, chromatographie et électrophorèse).

**Objectif 1** : Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

## La Technique d'isolement

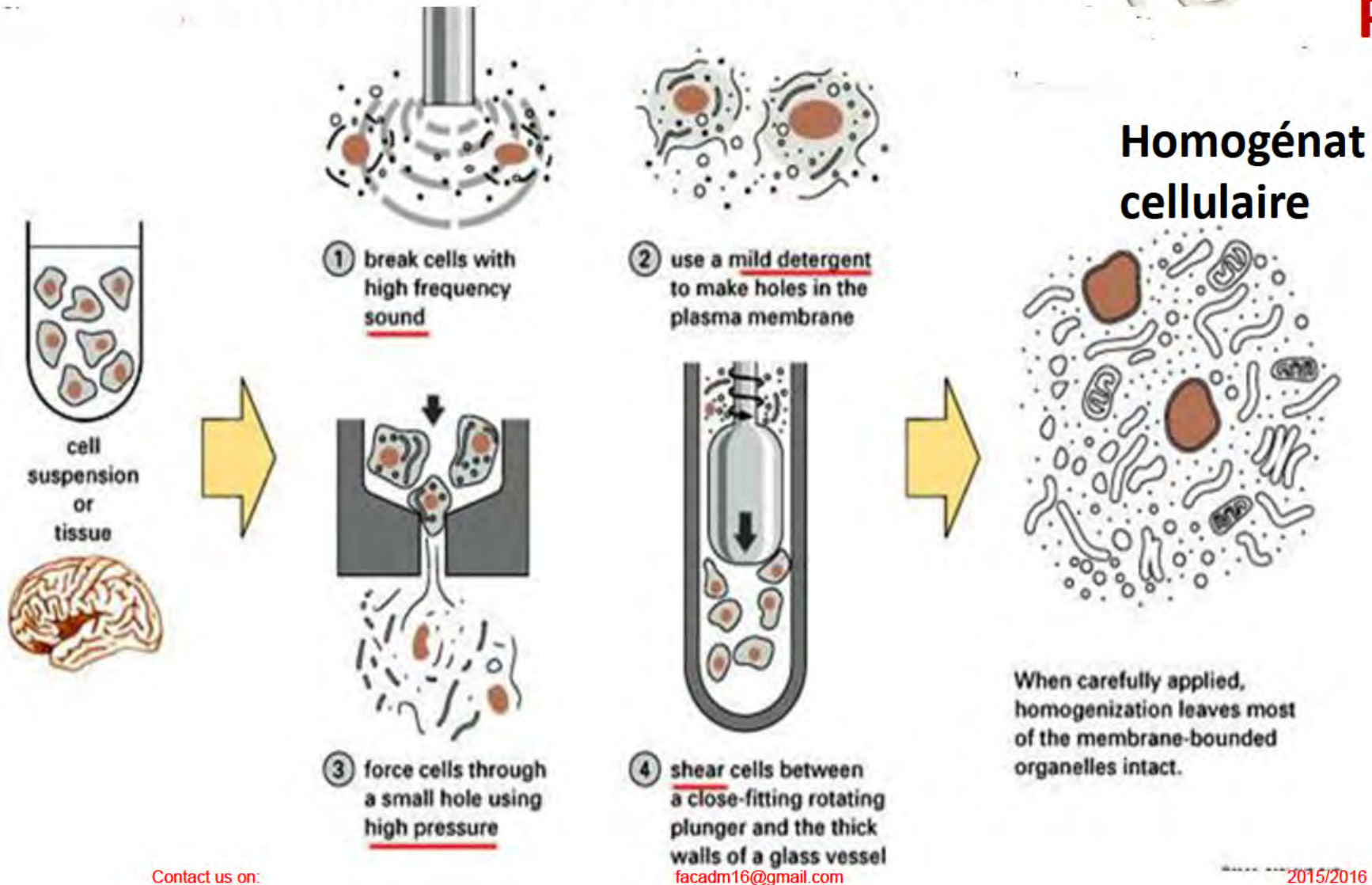




# Objectif 1 : Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

## 1 - Principe de fractionnement / homogénéisation

P .37



**Objectif 1** : Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

Les méthodes de **fractionnement** consistent à séparer les différents composants cellulaires par **destruction de la membrane plasmique**, puis par désorganisation de la cellule.

On obtient **un homogénat** avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intacts, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de **vésicules** appelées **microsomes**.



**Objectif 1 :** Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

## **2-** L'ultracentrifugation différentielle

La centrifugation différentielle permet la purification de l'homogénat en fonction de **la taille** et de **la densité** de ses constituants (macromolécules, organites ...). Pour se faire on centrifuge l'homogénat à différentes vitesses ; à chaque vitesse, différents organites se déposent dans le culot.

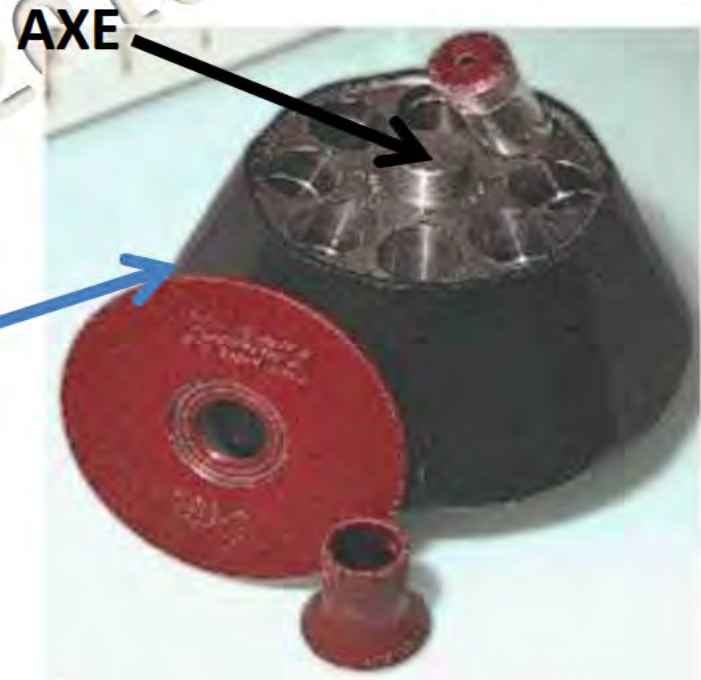
**L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse nommée centrifugeuse**

La vitesse de sédimentation est définie par le **coefficient de sédimentation en unité Svedberg (S)**.

**Objectif 1 :** Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD).

## **La centrifugeuse et centrifugation**

La **centrifugeuse** est constituée d'un **axe** portant un **rotor spécial**. Le rotor porte des **emplacements** qui peuvent recevoir des **tubes** contenant les **préparations biologiques**

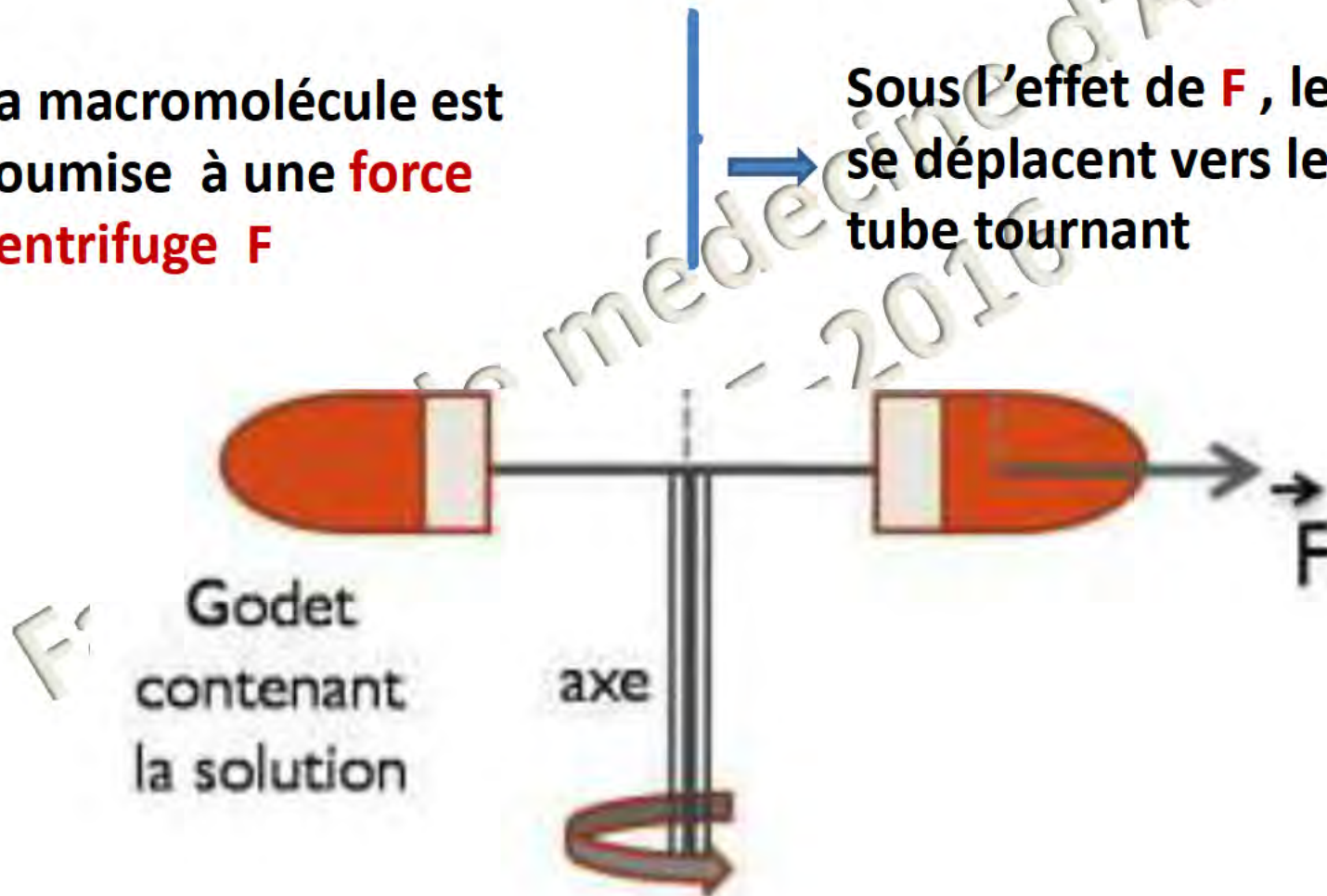




## Objectif 1 : Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD )

La macromolécule est soumise à une **force centrifuge F**

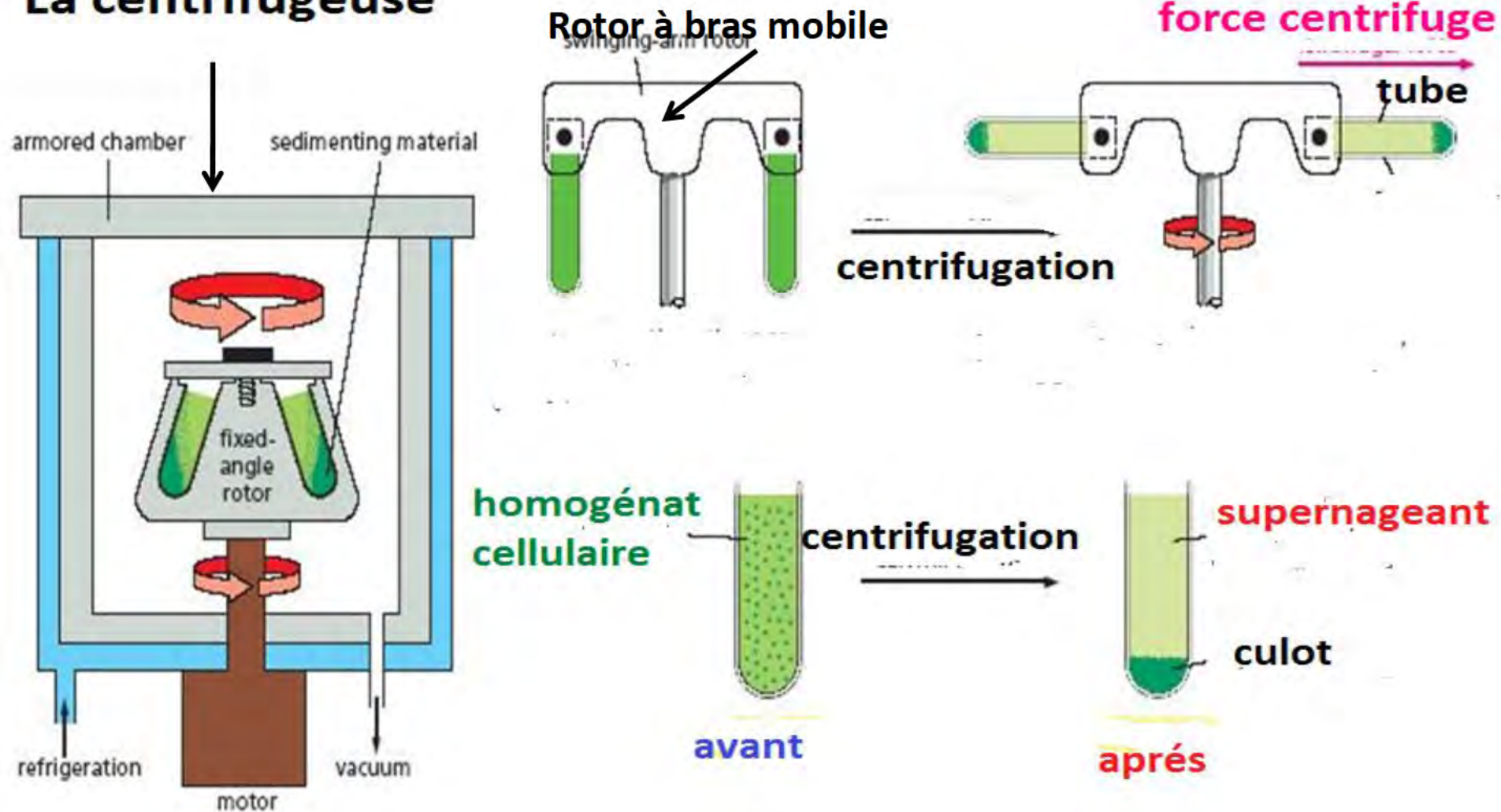
Sous l'effet de **F**, les molécules se déplacent vers le fond du tube tournant



# Objectif 1 : Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD )

ER

## La centrifugeuse

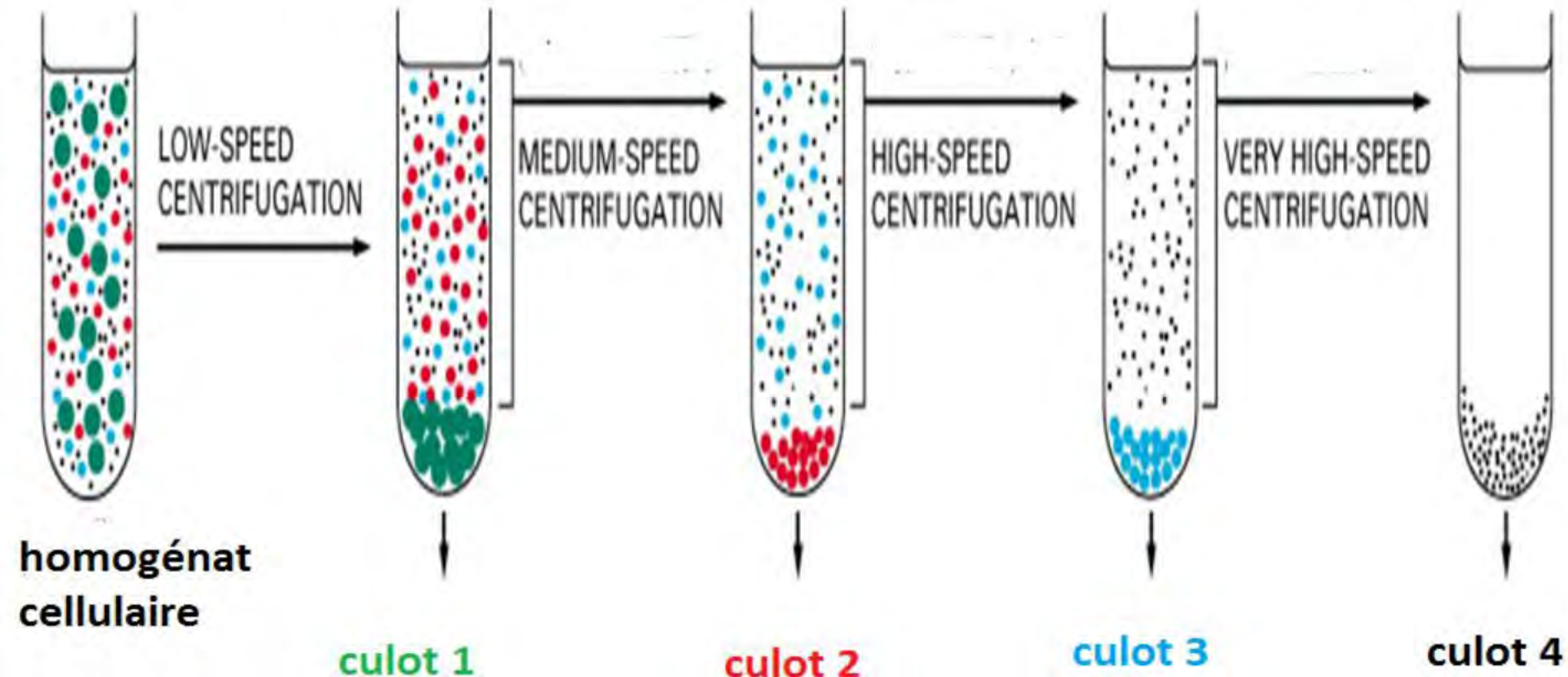




## Objectif 1 : Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD )

### 2 -1 - La centrifugation différentielle

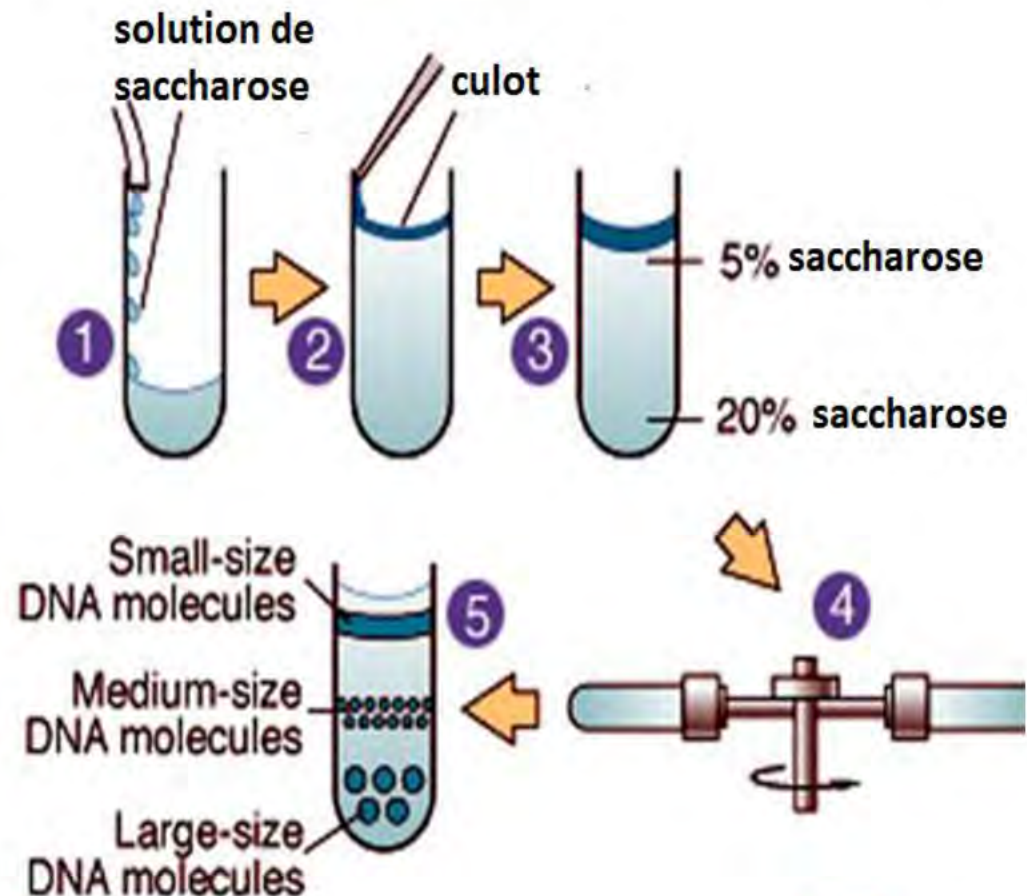
Les constituants de l'homogénat se déposent selon leur poids et leur taille



**Objectif 1 :** Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD )

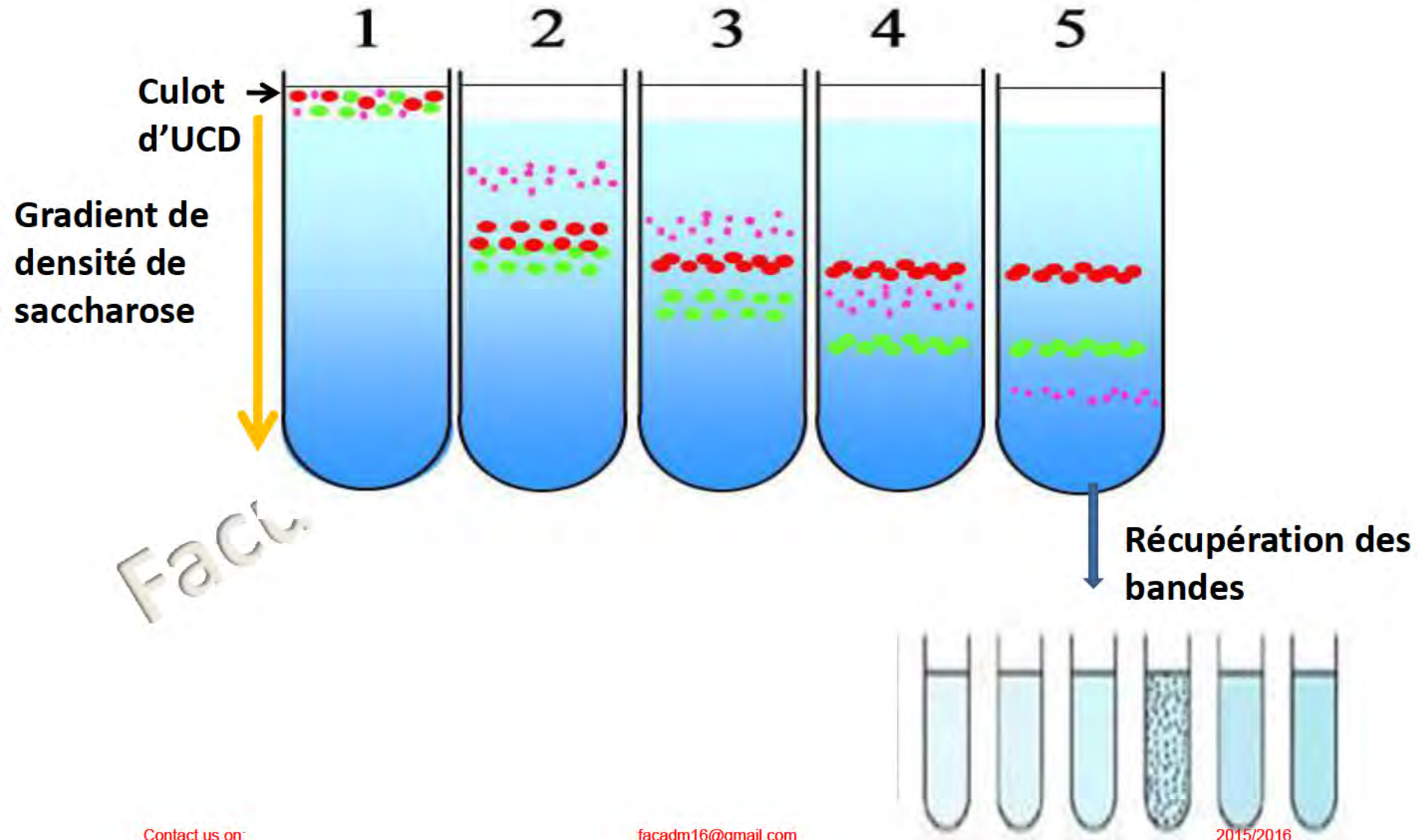
## 2- 2 - La centrifugation sur gradient de densité de saccharose UGD

La centrifugation (étape 4) entraîne le déplacement des **composants du culot** ( récupéré à l'UCD ) à travers le gradient de densité de saccharose et s'arrêtent en une bande à leur densité (étape 5) .

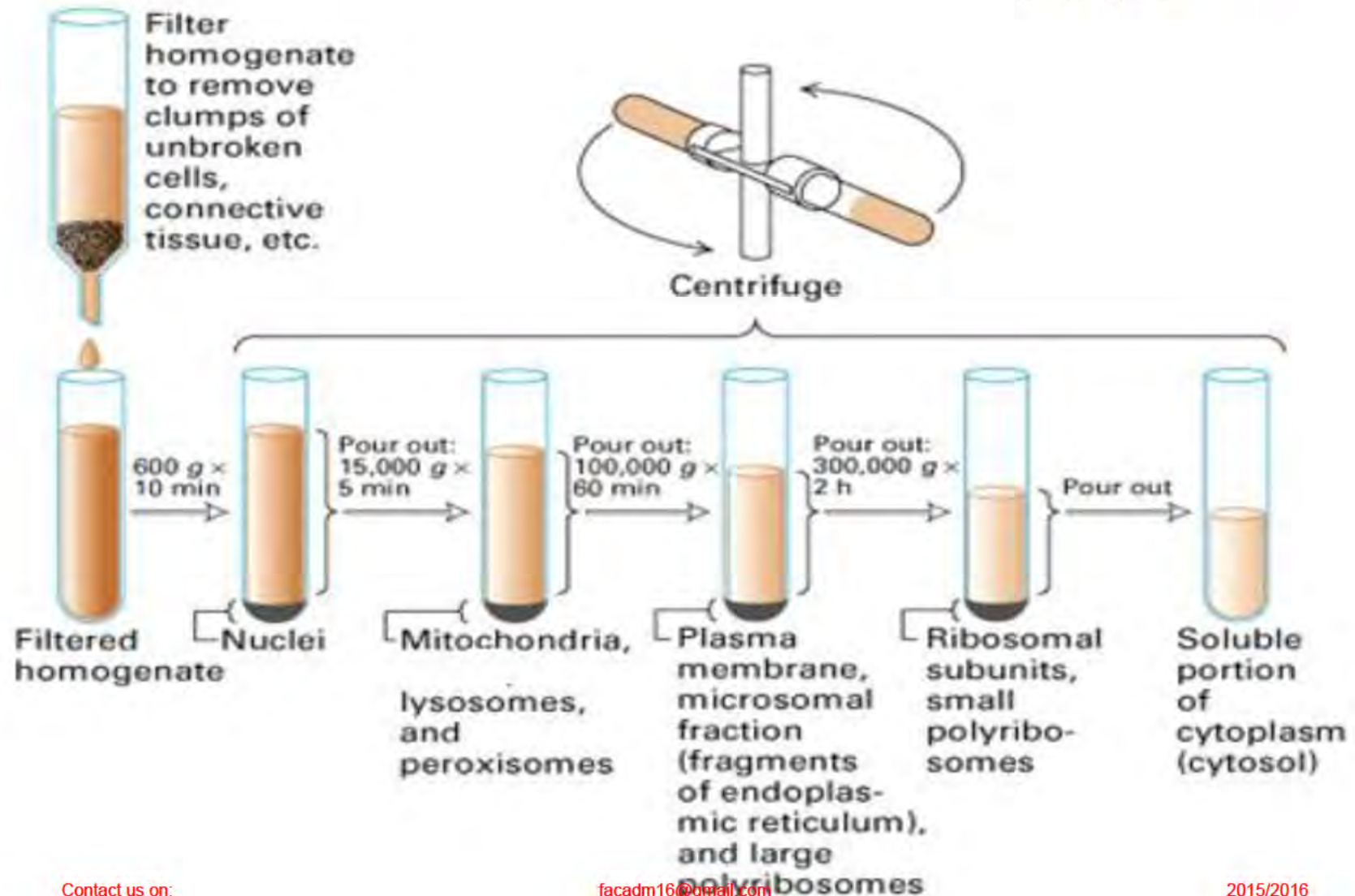




**Objectif 1 :** Citer les procédés d'isolement des composants cellulaires (UCD, UGD )



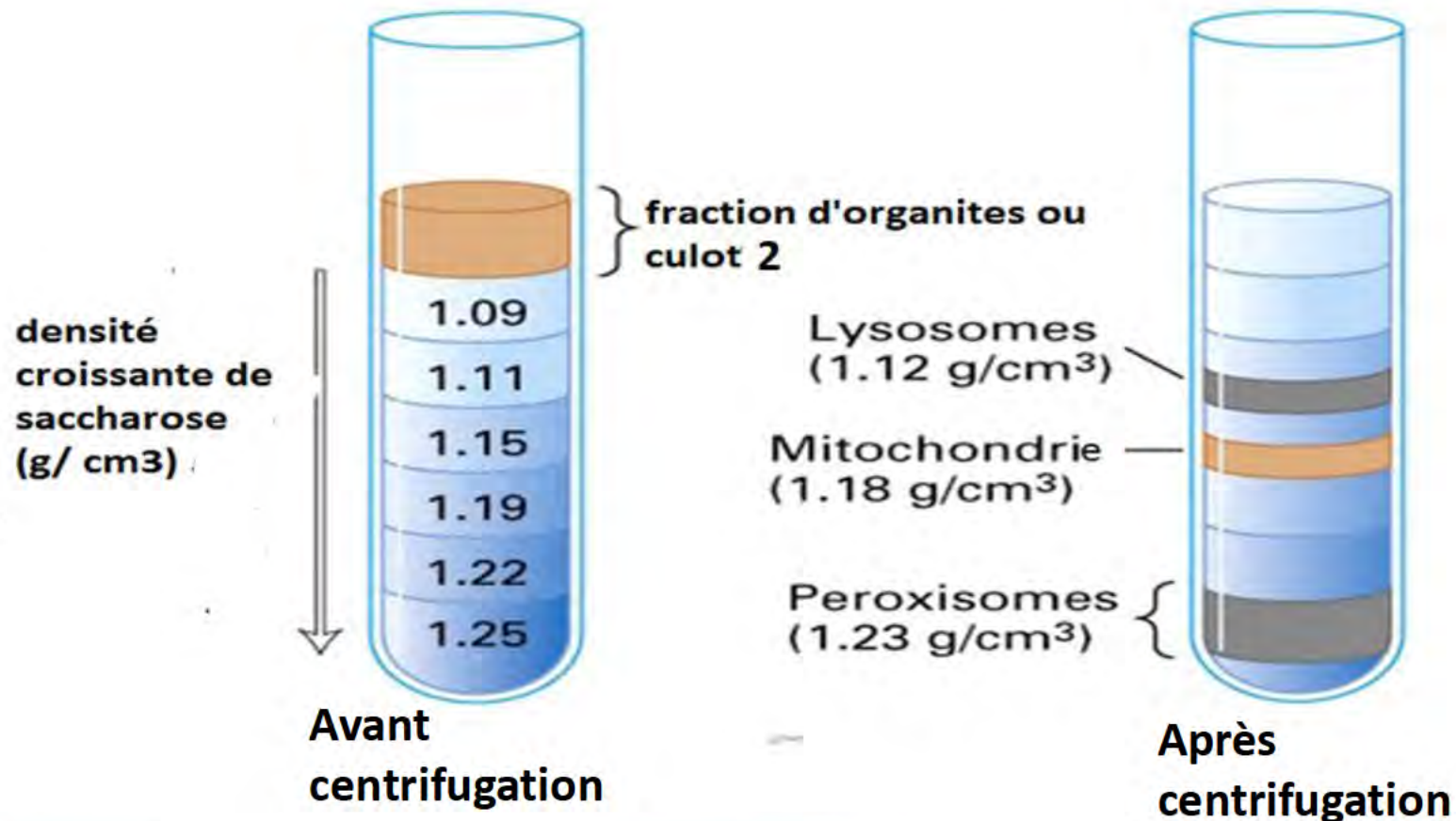
## Objectif 2 : Lister les structures obtenues dans chaque culot après application d'une ultra- centrifugation différentielle (UCD).

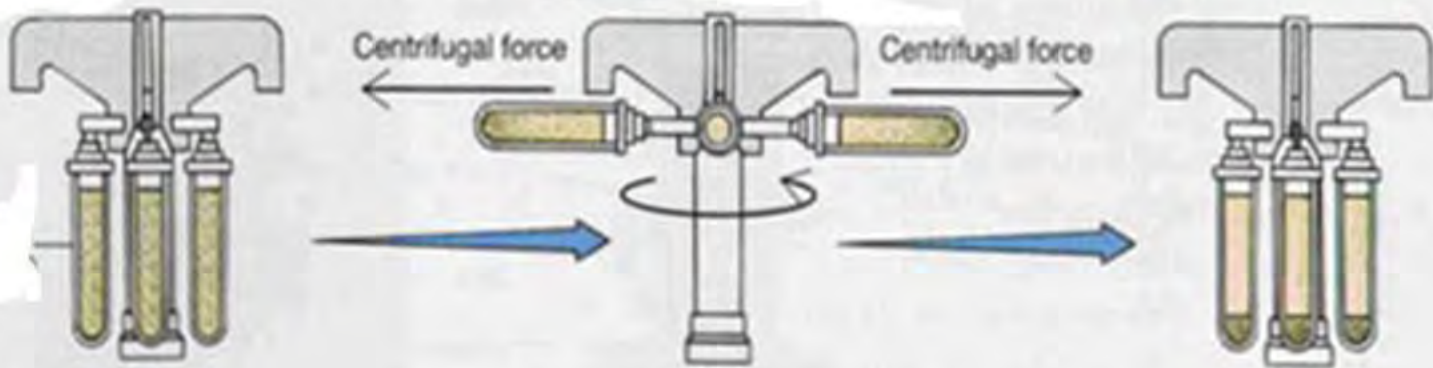
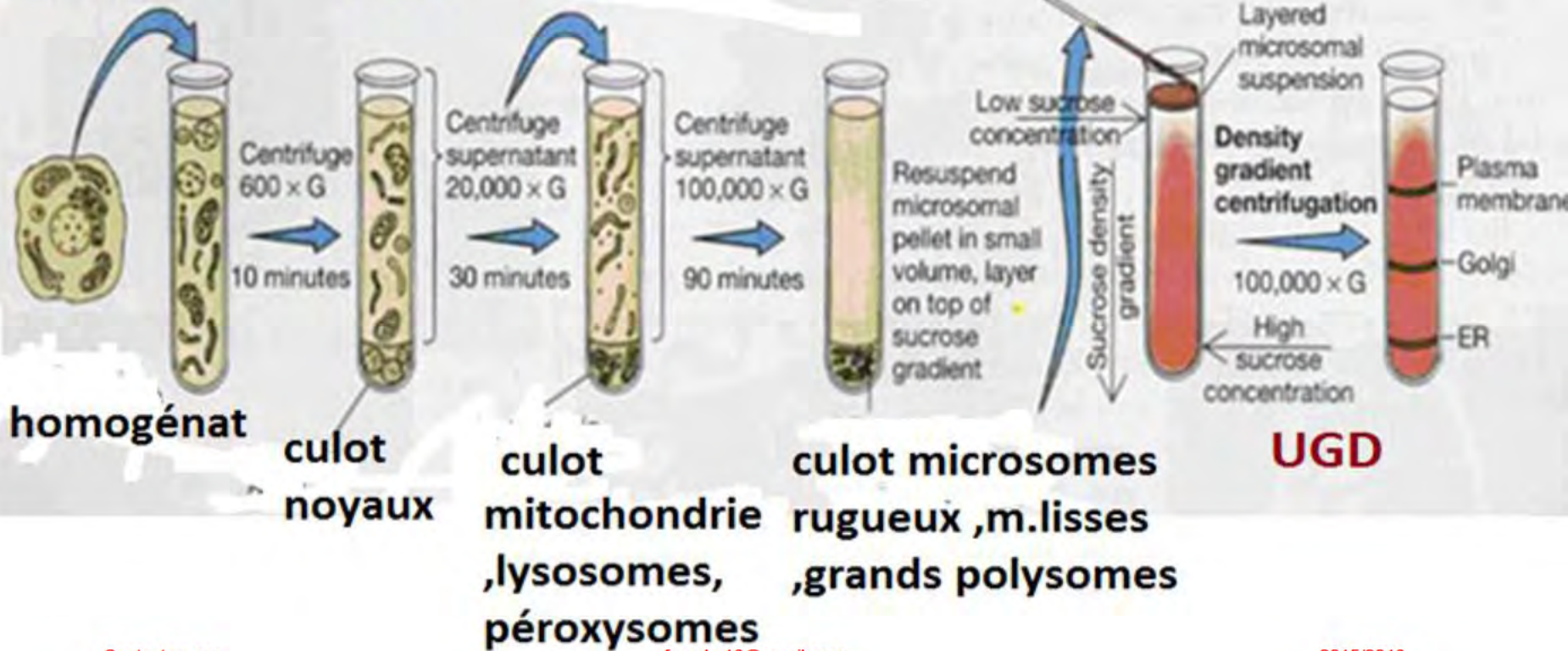




**Objectif 3 :** Lister les structures recueillies à partir de chaque culot après application d'une ultra centrifugation sur gradient de densité (**UGD**).

### Structures recueillies par UGD du 2<sup>eme</sup> culot



**A****homogénat  
cellulaire****B****UCD**



**Objectif 4** :Indiquer les techniques de contraste et d'analyse applicables sur les structures isolées (contraste négatif, chromatographie et électrophorèse) .

**1** - La Technique de coloration négative : **diapos 7 -8 -9** pour le contraste négatif des structures isolées(ribosomes ,macromolécules ,éléments du cytosquelette.... )

**2** - La chromatographie et l'électrophorèse : pour l'analyse biochimique des structures isolées par centrifugation .